

# TESIS DOCTORAL

*Doctoranda: María Pedraza Botí*  
*Director de tesis: Dr. Juan Andrés de Carlos Segovia*

## *HETEROGENEIDAD ONTOGÉNICA DE LAS POBLACIONES TEMPRANAS DEL TELENCÉFALO*







MINISTERIO  
DE ECONOMÍA  
Y COMPETITIVIDAD



CSIC

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



INSTITUTO  
CAJAL

*Dr. Juan A. De Carlos*

*Email: [decarlos@cajal.csic.es](mailto:decarlos@cajal.csic.es)*

*D. JUAN ANDRÉS DE CARLOS SEGOVIA, Investigador Científico del CSIC, con destino en el Departamento de Neurobiología molecular, celular y del desarrollo del Instituto Cajal,*

### *CERTIFICA*

*Que el trabajo titulado “**HETEROGENEIDAD ONTOGÉNICA DE LAS POBLACIONES TEMPRANAS DEL TELENCEFALO**”, ha sido realizado bajo mi dirección en nuestro laboratorio por Dña. María Pedraza Botí y reúne, a mi juicio, el suficiente rigor científico para optar al grado de Doctor.*

*Y para que conste, expido el presente certificado en Madrid a quince de Octubre de 2013.*

*Fdo.: Juan A. de Carlos Segovia*





En primer lugar agradecer a Juan y Laura por haberme permitido realizar esta tesis doctoral en el Instituto Cajal. A Juan en concreto por su atenta supervisión y enseñanza durante estos años.

Gracias a Zoltán por confiar en la última parte de este trabajo y formar parte de él. También agradecer a la que fuera su pupila, Guillermina, por permitirme realizar una estancia en su laboratorio. Aprendí mucho y fuisteis todos muy amables.

Por supuesto, este trámite no hubiese sido posible sin el apoyo de Nacho, Carlos, Carmen y Luis Miguel. No olvido a Ricardo, a FdC y a los chicos de administración y gerencia por su preocupación mostrada. Obviamente, no puedo olvidar a mis chicas de la biblioteca, todo esto se está “cociendo” en su casa, y como ellas dicen: me tienen adoptada ¡Pues gracias por ello chicas! Gracias también a mi querida Carmen (la verdadera jefa del Cajal), siempre sacas alegrías de las penas. Gracias Maite, Raúl, Jesús, Fide, etc. por regalarme risas y chistes a cualquier hora. Gracias a las chicas de recepción, por desearme los buenos días cada mañana durante más de cinco años. Ante todo, a mi querido Aurelio, por aguantar mis monólogos ¡Cómo me alegras las largas tardes de biblioteca! Carmen, Belén, Silvia, Noelia... Gracias por nuestras interminables charlas en la oscuridad, y ante todo por aguantar los pitidos de la impresora: ¡Benditas seáis! Laude, Emi, y el resto de personal del animalario ¿Qué os voy a contar? ¡Nada de esto sería posible sin vosotras! Millones de gracias.

Agradecer a todos y cada uno de los Cajalinos. Permítanme que nombre al laboratorio “mosquitero”: gracias chicos por vuestros empujoncitos. A Ángel por mostrar interés todas y cada una de las veces en las que se ha cruzado conmigo por los pasillos y por aportar conversaciones interesantísimas sobre ciencia. A Sergio porque, querido, hay que arriesgar y aquí estoy, sentada en la biblioteca observando la portada de Pink Floyd de mi pseudotesis y agradeciendo. Por supuesto a mi Little Hairen, empezamos esta aventura juntas como buenas “polluelas” y aquí estamos. También tengo que agradecer en especial a mi Martita. Gracias por regalarme sonrisas, y ante todo serenidad, durante este tiempo. Especial agradecimiento de nuevo a mis dos Andreas y a Fran por ser mis súper compis de clase. A Irene, Sara, Noe, Lula y demás... ¡Gracias!

Gracias a la Asociación Conciencia, porque, pese al distanciamiento, sois un grupo maravilloso y estáis a mi lado en los buenos y malos momentos. Siempre. Miriam, a ti mil gracias por nuestras conversaciones sádico-festivas en las que intentamos cambiar el mundo.

¡Gracias mis queridos perrazos (el © se lo lleva Edu)! Antonio, Gonzalo, Azahara, Raúl, Edu y Jorge. Señores, quédense con estos nombres porque de aquí sale un premio Nobel. Ríanse ustedes del club de los poetas muertos ¡He de agradecerlos tanto! ¡Viva los exiliados!

Por supuesto, gracias a todo aquel que en algún momento ha formado parte del A21. A los que se fueron y a los que aguantan estoicamente: Blanchi, Lau, Fer, Edu, Jorge, Andresito, Ángel, Rebe, Marcelo, Nieves, Sandrita, Yoli, Mariam, Raúl, Mariu... ¡Gracias, gracias y más gracias! Siempre habéis estado mucho más que pendientes de mí, siempre me habéis tendido una mano cuando lo he necesitado y cómo no, siempre os habéis mostrado como grandísimos compañeros. Jorgito, a ti una mención personal, no sólo por no haberte agradecido en mi PFC, sino porque para mí siempre serás mi director virtual de tesis. Eres mi “guía” y mi hermano mayor científico,

## Agradecimientos

---

y ante todo: ¡Mi amigo! Ése que aguanta tifones por mí y da la cara por ello. Ése que me da la enhorabuena cuando todos me dan el “lo siento” ¡Nunca sabrás lo agradecida que estoy! Ésta también es tu tesis y siento si no ha quedado como queríamos pero, ya sabes, “está hecha por una humana”.

Esto ya lo escribí una vez, pero gracias a mi familia madrileña, Argentina’s (madre e hija) y Jaime. Es un verdadero placer haberos conocido, me abristeis las puertas de la que ahora considero mi ciudad y habéis vivido toda esta tesis casi casi en primera persona.

A mis recientes compis de aventuras: Álvaro, Maca, Tonino, Alba, Alberto, Miguel, Román, Cindy, Zahara... ¡gracias! Porque mostráis interés no sólo por la ciencia, sino por mi ciencia, por esta tesis. Sois un gran apoyo y estoy encantada de estar rodeada de gente como vosotros.

¡Cómo no! Llamémoslas Mafia 2000, llamémoslas alcoyanas, llamémoslas mi “familia amiguil”: Monty, Paula, Ana, Leti, Marta, Ro, Lidia, Omara, Andrea, Alma... ¡A ellas gracias! Presumo orgullosísima de mis amigas y ¿saben? Sorprendentemente ellas de mí también. Lo que ellas desconocen, “pobretes meues”, es que tiene más valor el que aguanta a un doctorando que el mismo doctorando.

Tras intentar empezar a escribir este párrafo 23 veces, me doy cuenta de lo imposible que es escribir algo que verdaderamente plasme todo lo que les tengo que agradecer. Son ellos. MI FAMILIA. Mis tíos, primos, sobrinos... gracias por tener fe en mí, porque me consideráis fuerte y aunque realmente no lo sea, vosotros me dais lo necesario para que lo crea, y por ende, al final lo sea. Mi hermanito mayor Nacho, gracias por jurar un día que me cuidarías siempre, no has dejado de hacerlo y mira, al menos salgo de ésta con una tesis debajo del brazo... o eso espero. La fuerza que más me empuja es saber que tú has logrado luchar contra demonios y salir airoso de ello, y como buena hermana pequeña que soy, he de seguir tu ejemplo ¡A por ellos bro! Gracias también a mi querida cuñada Noe y a mis dos vidas (sí, tengo dos) Ari y Carla, son las únicas capaces de hacerme desconectar transportándome a su mundo de algodón rosa con un par de sonrisas. Mamá (La Macu para el resto del mundo), ¿a ti qué no te voy a agradecer? Ésa sería la pregunta. Si es que te lo agradezco todo. Esta tesis está escrita gracias a ti, cada página. Todo. Porque me empujas a lo bueno y me haces afrontar lo malo. Porque lo que soy viene de ti. Porque mi único propósito es poder llegar a tener al menos un 1% de tu valentía, de tu honradez, de tu dulzura, tu resistencia, tu saber estar, tu... ¡todo!

Y bueno, pipiolo, otro al que no sé qué no agradecer. Eres mi mitad. Gracias, porque un día “me imaginaste conduciendo igual de asustada por lo que dejaba detrás y lo que había delante”. Y bueno, ya hemos pasado parte de ese “delante” juntos, y que haya muchos “delantes” más, esperemos que con menos curvas... Gracias, en fin, por elegir a una escorpio de manual como tu compañera de aventuras, mi querido pipi-géminis.

Y no hay más que vosotros: abuelos, papá. El legado que habéis dejado es mucho más que suficiente para sentirlos a mi lado aunque no estéis. Papá, mi valiente caballero, te dedicaría ésta y mil tesis más, con todos los baches y penas del camino, TODO, cualquier cosa para que te sintieras orgulloso de mí. Sé que siempre lo estuviste. Me diste la fuerza necesaria para que no me rindiera nunca. Y es que, no podrás ver crecer a mis futuros Pepitos, pero sí has visto gestar parte de esta tesis, que hoy es tuya padre. Sonríe para mí.

**A mi padre**

“Si yo me presento, tú te presentas”



*Soy de los que piensan que la ciencia tiene una gran belleza. Un sabio en su laboratorio no es solamente un teórico. Es también un niño colocado ante los fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas. No debemos dejar creer que todo progreso científico se reduce a mecanismos, máquinas y engranajes, que, de todas maneras, tienen su belleza propia... Tampoco creo que peligre en nuestro mundo la desaparición del espíritu de aventura. Si veo alrededor mío algo de vital es precisamente este espíritu de aventura que parece indesarraigable, y que, claro está, se halla emparentado con la curiosidad.*

**Marie Curie**

**Intervención en el debate internacional sobre El porvenir de la Cultura.  
Residencia de Estudiantes. Madrid**

**5 de Mayo de 1933**



## ABREVIATURAS







<b>APO</b>	área preóptica	<b>PVc</b>	palio ventral caudal
<b>BDB</b>	banda diagonal de Broca	<b>PVr</b>	palio ventral rostral
<b>CC</b>	corteza cerebral	<b>SB</b>	sustancia blanca
<b>CII</b>	capa 2 de corteza olfativa	<b>Sp</b>	septum
<b>CII/III</b>	capa 2 y 3 de corteza olfativa	<b>SP</b>	subplaca
<b>CIII</b>	capa 3 de corteza olfativa	<b>SSE</b>	surco septo-eminencial
<b>CO</b>	corteza olfativa	<b>ST</b>	estriado
<b>CP</b>	corteza piriforme	<b>TD</b>	telencéfalo dorsal
<b>EGC</b>	eminencia ganglionar caudal	<b>TDM</b>	telencéfalo dorsal medial
<b>EGL</b>	eminencia ganglionar lateral	<b>TDR</b>	telencéfalo dorsal rostral
<b>EGLd</b>	eminencia ganglionar lateral dorsal	<b>TO</b>	tubérculo olfativo
<b>EGLv</b>	eminencia ganglionar lateral ventral	<b>tol</b>	tracto olfatorio lateral
<b>EGM</b>	eminencia ganglionar medial	<b>V</b>	capa 5 de corteza cerebral
<b>End</b>	núcleo endopiriforme	<b>V/VI</b>	capas 5 y 6 de corteza cerebral
<b>FPS</b>	frontera palio subpalio	<b>VI</b>	capa 6 de corteza cerebral
<b>I</b>	capa 1 de corteza cerebral	<b>VL</b>	ventrículo lateral
<b>II</b>	capa 2 de corteza cerebral	<b>ZI</b>	zona intermedia
<b>III</b>	capa 3 de corteza cerebral	<b>ZIB</b>	zona intermedia baja
<b>IV</b>	capa 4 de corteza cerebral	<b>ZM</b>	zona marginal
<b>MMRT</b>	muro medial rostral telencefálico	<b>ZSV</b>	zona subventricular
<b>ne</b>	neuroepitelio cortical	<b>ZV</b>	zona ventricular
<b>PC</b>	placa cortical		
<b>PD</b>	palio dorsal		
<b>PL</b>	palio lateral		
<b>PM</b>	palio medial		
<b>PP</b>	preplaca		
<b>PV</b>	palio ventral		



## ÍNDICE





<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
I. EL SISTEMA NERVIOSO	3
A. DESARROLLO DEL SISTEMA NERVIOSO	3
i. Desarrollo telencefálico	5
a. Desarrollo de la corteza olfativa	6
b. Desarrollo de la corteza cerebral	7
II. LA SUBPLACA Y SU FUNCIÓN	13
A. TIPOS CELULARES Y PATRÓN DE EXPRESIÓN DE LA SUBPLACA	17
B. DESARROLLO DE LA SUBPLACA	20
<b>OBJETIVOS</b>	<b>23</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>27</b>
I. ANIMALES	29
II. ESTUDIOS DE PROLIFERACIÓN CELULAR	30
III. CULTIVO DE EMBRIONES COMPLETOS	31
IV. EXPERIMENTOS INTRAUTERINOS	33
V. TRAZADORES E INYECCIONES	34
VII. SÍNTESIS DE RETROVIRUS	35
VIII. ELECTROPORACIONES	36
IX. INMUNOHISTOQUÍMICA	36
X. ADQUISICIÓN DE LA IMAGEN	38
XI. ANÁLISIS DE COLOCALIZACIÓN	38
XII. SOLUCIONES COMMUNMENTE UTILIZADAS	39
<b>RESULTADOS</b>	<b>41</b>
I. EVOLUCIÓN EN EL PATRÓN DE EXPRESIÓN DE DISTINTOS MARCADORES DE LA CORTEZA OLFATIVA A LO LARGO DEL DESARROLLO EMBRIONARIO	43
A. EXPRESIÓN DE TBR1 DURANTE EL DESARROLLO DE LA CORTEZA OLFATIVA	43
B. EXPRESIÓN DE CALRETININA DURANTE EL DESARROLLO DE LA CORTEZA OLFATIVA	43
C. EXPRESIÓN DE CALBINDINA DURANTE EL DESARROLLO DE LA CORTEZA OLFATIVA	43

D. EXPRESIÓN DE RELINA DURANTE EL DESARROLLO DE LA CORTEZA OLFATIVA	46
E. MARCADORES ASOCIADOS CON EL LUGAR DE GENERACIÓN DE LAS CÉLULAS DE LA CORTEZA OLFATIVA	46
II. NUEVAS ÁREAS DE GENERACIÓN DE LAS CÉLULAS DE LA CORTEZA OLFATIVA	48
A. MIGRACIÓN DESDE EL SEPTUM	49
B. MIGRACIÓN DESDE EL PALIO VENTRAL	51
C. ANÁLISIS POSTNATAL DE LA MIGRACIÓN CELULAR DESDE EL SEPTUM Y EL PALIO VENTRAL	53
III. ONTOGENIA DE LAS CÉLULAS DE LA SUBPLACA	55
A. LUGARES DE ORIGEN DE LAS CÉLULAS DE LA SUBPLACA	55
i. Origen extra-cortical de la subplaca: El Muro Medial Rostral Telencefálico	57
a. Tiempo de generación de las células de la subplaca provenientes del MMRT	58
b. Migración celular desde las áreas adyacentes al MMRT	58
c. Caracterización de las células de la subplaca provenientes del MMRT	60
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>67</b>
I. ESPECIFICIDAD DE MARCADORES EN DISTINTAS ÁREAS DURANTE EL DESARROLLO DEL TELENCEFALO	69
A. RESTRICCIÓN DE MARCADORES DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO DE CORTEZA OLFATIVA	69
B. TBR1 COMO FIABLE MARCADOR ESTRUCTURAL PERO NO COMO MARCADOR FIABLE DE CÉLULAS DERIVADAS DE PALIO	70
II. EL PALIO VENTRAL Y EL SEPTUM COMO DOS NUEVAS ÁREAS DE GENERACIÓN DE CÉLULAS DE LA CORTEZA OLFATIVA	71
A. CÉLULAS OLFATIVAS GENERADAS EN EL PALIO VENTRAL Y EL SEPTUM	71
B. EL PALIO VENTRAL Y EL SEPTUM NO SON FUENTES DE NEURONAS CORTICALES	72
C. LOS MARCADORES PALIALES Y SUBPALIALES COMUNMENTE	

UTILIZADOS NO SON ALTAMENTE ESPECÍFICOS	73
III. ORIGEN EXTRA-CORTICAL DE LAS CÉLULAS DE LA SUBPLACA	74
A. EL MURO MEDIAL ROSTRAL TELENCEFÁLICO COMO ÚNICO ORIGEN EXTRA-CORTICAL DE LA SUBPLACA	75
B. LA HETEROGENEIDAD FENOTÍPICA DE LA SUBPLACA SE REDUCE A UNA HETEROGENEIDAD ONTOGÉNICA	78
C. ORIGEN PALIAL DE CÉLULAS GABAÉRGICAS CORTICALES	78
D. MIGRACIÓN TANGENCIAL DE CÉLULAS CORTICALES DE PROYECCIÓN	80
IV. APROXIMACIONES METODOLÓGICAS PARA LA MEJORA DEL TRAZADO DE POBLACIONES CELULARES CONCRETAS	82
A. FOCALIDAD MEDIADA POR INYECCIÓN LOCAL DE TAMOXIFEN	82
B. FOCALIDAD MEDIADA POR INYECCIÓN DE COLÁGENO	83
C. RETROVIRUS NO SILENCIANTES: NUEVA APROXIMACIÓN AL ANÁLISIS CLONAL FOCAL	84
D. GANACIA DE INFORMACIÓN MEDIANTE INTEGRACIÓN PLASMÍDICA	85
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>87</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>91</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>101</b>





# INTRODUCCIÓN





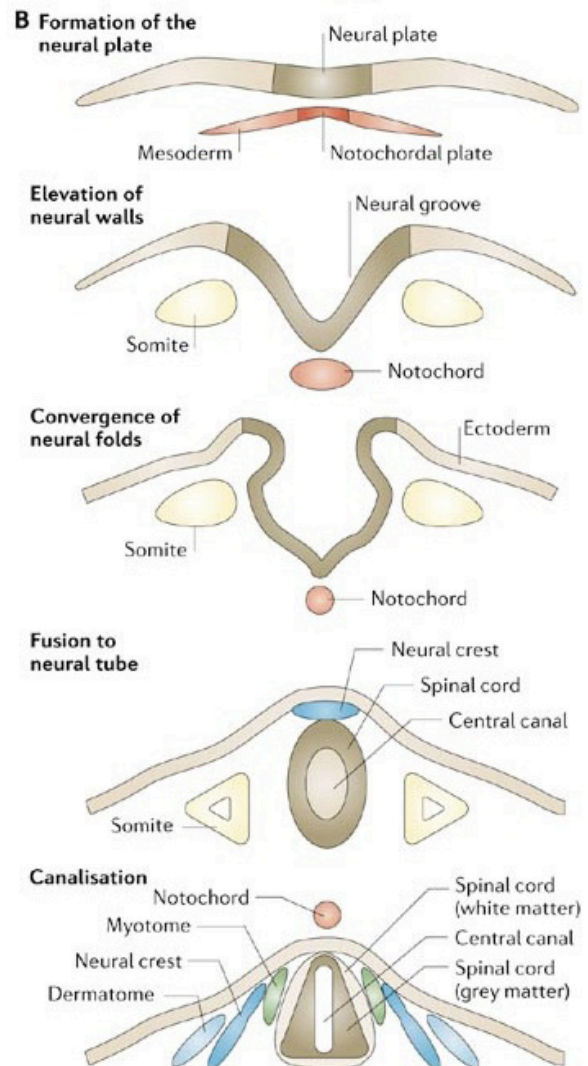
## I. EL SISTEMA NERVIOSO

El sistema nervioso es el conjunto de órganos interconectados responsables de enviar, recibir e interpretar la información proveniente de todas las partes del cuerpo. Este sistema monitoriza y coordina la función orgánica interna y responde a cambios en el ambiente externo. Su unidad funcional es una célula especializada denominada neurona, capaz de generar una diferencia de potencial eléctrico entre los lados interno y externo de su membrana y, además, conducirla a lo largo de ella. A esto último se le denomina excitabilidad de membrana, que es la responsable de la transmisión de la información nerviosa entre zonas, e incluso de la conducción bidireccional de la información entre el exterior y el interior del cuerpo. Para que todo esto suceda, es necesaria la unión funcional entre dos neuronas, denominada sinapsis, y aunque en principio bastarían sólo dos neuronas para crear esta unión funcional, a día de hoy es sabido que pueden intervenir otro tipo de células neurales, las células de la glía, que no sólo actúan a nivel trófico (para revisión Araque, 2008).

### A. DESARROLLO DEL SISTEMA NERVIOSO

El sistema nervioso proviene del neuroectodermo, región situada a lo largo de la línea dorso-medial del embrión que deriva de la primera hoja blastodérmica, el ectodermo, tras recibir una serie de señales desde el mesodermo colindante, en concreto desde una estructura efímera denominada

notocorda. A este proceso se le denomina inducción neural, que precede a la formación del tubo neural, constituido por un epitelio columnar pseudoestratificado que dará lugar posteriormente a las células neurales: neuronas y glía, de todo el sistema nervioso (Figura 1).



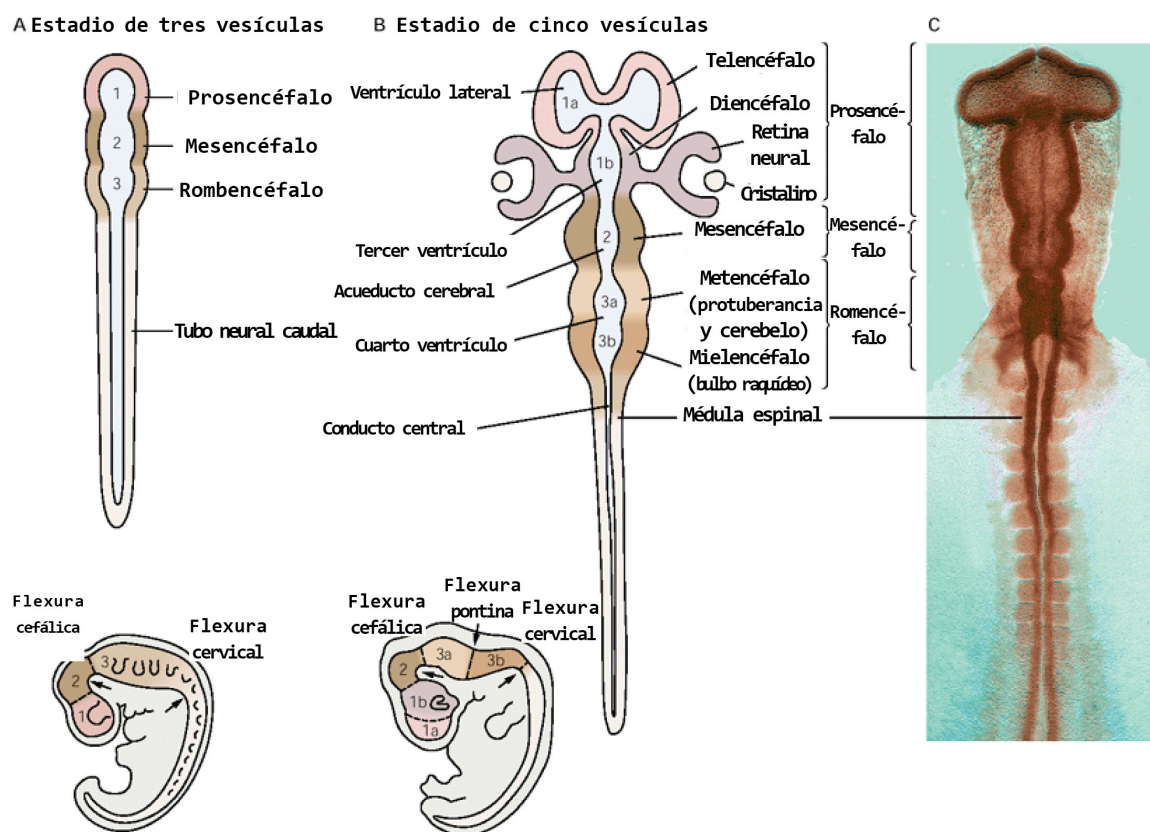
**Figura 1. Imagen tomada de Blom y col., 2006. Fases de formación del tubo neural.** Diagrama de los estadios de la formación del tubo neural en secciones transversales. Se forma la placa neural debido a la captación de señales provenientes del mesodermo adyacente (la notocorda). La placa neural se eleva para formar los pliegues neurales, que progresivamente se aproximan acabando por fusionarse para crear un tubo neural cerrado.

## Introducción

El tubo neural inicialmente se encuentra abierto en sus extremos anterior y posterior, denominándose a estas aperturas neuroporos. Los neuroporos deben cerrarse y es en ese preciso momento en el cual comienza su diferenciación. La porción caudal de tubo neural que presenta notocorda de un modo adyacente y ventral a él, acabará diferenciándose en médula espinal. Sin embargo, la porción rostral, sin notocorda adyacente, se diferenciará en encéfalo.

El encéfalo consta inicialmente de tres vesículas (de anterior a posterior): prosencefálica,

mesencefálica y rombencefálica. El cerebro anterior se diferencia a partir de la primera de ellas, el prosencéfalo, que dará lugar en estadios más avanzados a vesículas secundarias (Figura 2). La zona anterior de la vesícula prosencefálica se ensanchará formando a una estructura par, el telencéfalo (con sus hemisferios cerebrales primitivos), y la zona más posterior dará lugar al diencefalo. El mesencéfalo, la siguiente vesícula en el eje antero-posterior, se diferenciará dando lugar al cerebro medio y permanecerá sin dividirse a lo largo del desarrollo. Y por último, el



**Figura 2. Imagen modificada de Kandel y col., 2001. Desarrollo del tubo neural.** (A-B) Diagrama del desarrollo de las vesículas encefálicas en visiones dorsales del tubo neural. (A) El tubo neural se diferencia en tres vesículas en su parte anterior. (B) La primera junto con la tercera vesícula se dividen generando el estadio de cinco vesículas que se comunican por el sistema ventricular, por donde transcurre el líquido cefalorraquídeo. (C) Foto, en visión dorsal, del embrión de pollo en estadio de cinco vesículas. (D,E) Esquema de embriones, en visión lateral, en los mismos estadios que en A y B, donde se ilustran las distintas flexuras.

cerebro posterior se diferencia a partir de la vesícula más posterior, el rombencéfalo, que se divide dando lugar a nuevas vesículas secundarias, el metencéfalo y el mielencéfalo (Figura 3).

El sistema ventricular es el derivado de la cavidad interna del tubo neural. En el cerebro adulto algunos de los ventrículos quedan obliterados pero durante el desarrollo son de gran tamaño. El telencéfalo envuelve a los ventrículos laterales (I y II), el diencéfalo al ventrículo III y los derivados del rombencéfalo al ventrículo IV.

## i. Desarrollo telencefálico

Como hemos mencionado previamente, las vesículas telencefálicas provienen de un ensanchamiento de la vesícula inicial prosencefálica. El telencéfalo se desarrolla a partir de un fino neuroepitelio hasta llegar a formar una compleja estructura que incluye a la corteza cerebral (neocorteza), el hipocampo (arquicorteza), la corteza olfativa (paleocorteza) y a los ganglios basales:

cuerpo estriado y amígdala.

Cada estructura encefálica se compone de muchas poblaciones celulares que se generan desde distintas localizaciones durante una ventana temporal embrionaria y cada cual expresa distintos marcadores celulares (García-Moreno y col., 2008; De Carlos y García-Moreno, 2009 para revisión). Se requiere una extrema precaución cuando se atribuye un marcador específico a una población celular dada que puede presentar una expresión no uniforme a lo largo de su desarrollo espacio-temporal. Varios marcadores específicos para distintas áreas del sistema nervioso han sido descritos. Por ejemplo, el telencéfalo se encuentra dividido en palio y subpalio, debido a la influencia de factores dorsales como BMP4 (Lee y Jessell, 1999; Liem y col., 2000) y ventrales como Shh (Echelard y col., 1993; Fan y Tessier-Lavigne, 1994; Martí y col., 1995) durante el desarrollo. El palio se divide en cuatro regiones, según su posición espacial, conocidas como palio

Estadio de tres vesículas	Estadio de cinco vesículas	Estructuras derivadas maduras	Cavidad relacionada
<b>Prosencéfalo</b>	Telencéfalo	Corteza cerebral, corteza olfativa, ganglios basales, hipocampo, complejo amigdalino, bulbos olfativos	Ventrículos laterales (I y II)
	Diencéfalo	Tálamo, hipotálamo, epítalamo, subtálamo, retina, nervios y cintillas ópticas	III ventrículo
<b>Mesencéfalo</b>	Mesencéfalo	Mesencéfalo	Acueducto cerebral
<b>Rombencéfalo</b>	Metencéfalo	Protuberancia y cerebelo	IV ventrículo
	Mielencéfalo	Bulbo raquídeo	
<b>Tubo neural caudal</b>	Tubo neural caudal	Médula espinal	Conducto central

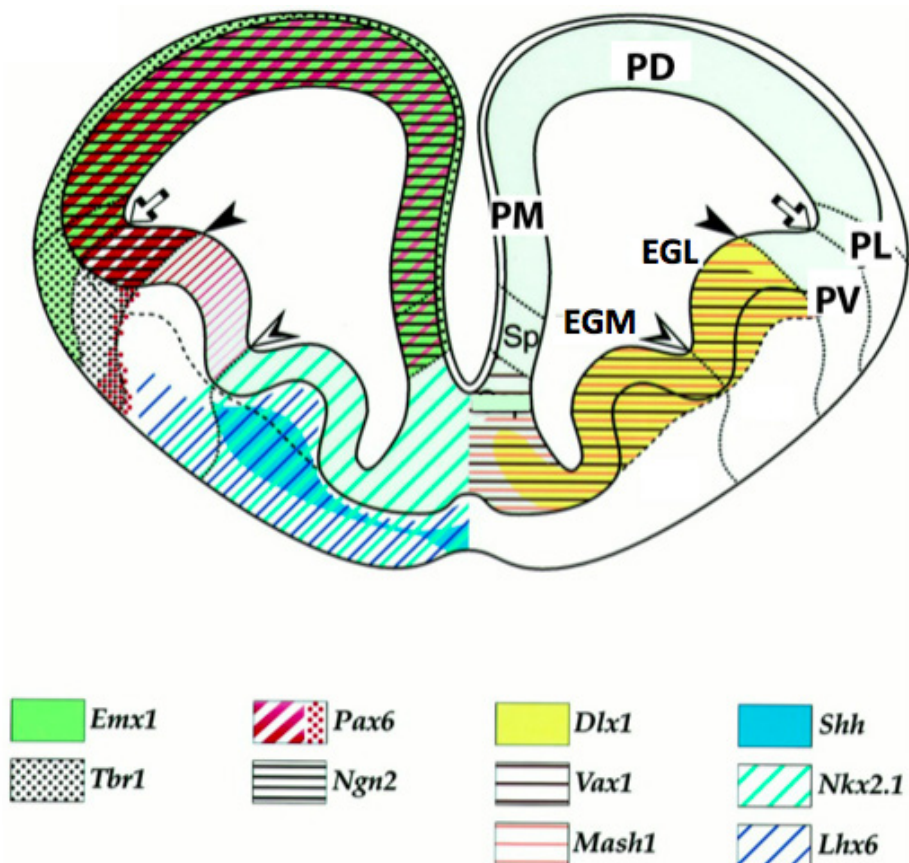
**Figura 3.** Tabla en la que se observan las distintas estructuras a las que dan lugar las vesículas encefálicas.

medial, palio dorsal, palio lateral y palio ventral. Cada una de estas subdivisiones genera diferentes derivados cerebrales del adulto. A su vez, el territorio subpalial se divide en distintas estructuras: el septum y las eminencias ganglionares lateral, medial y caudal (Figura 4). En principio, cada una de estas zonas da lugar a poblaciones celulares que expresan marcadores específicos, como es el caso del T-box brain 1 (*Tbr1*), propuesto para ser un marcador típico de células derivadas de palio (Puelles y col., 2000), aunque su expresión fue en principio descrita como algo independiente del lugar

de origen (Bulfone y col., 1995). Con lo cual, a día de hoy todavía existe controversia en el ámbito de atribuir una función a un marcador ontogénico.

### a. Desarrollo de la corteza olfativa

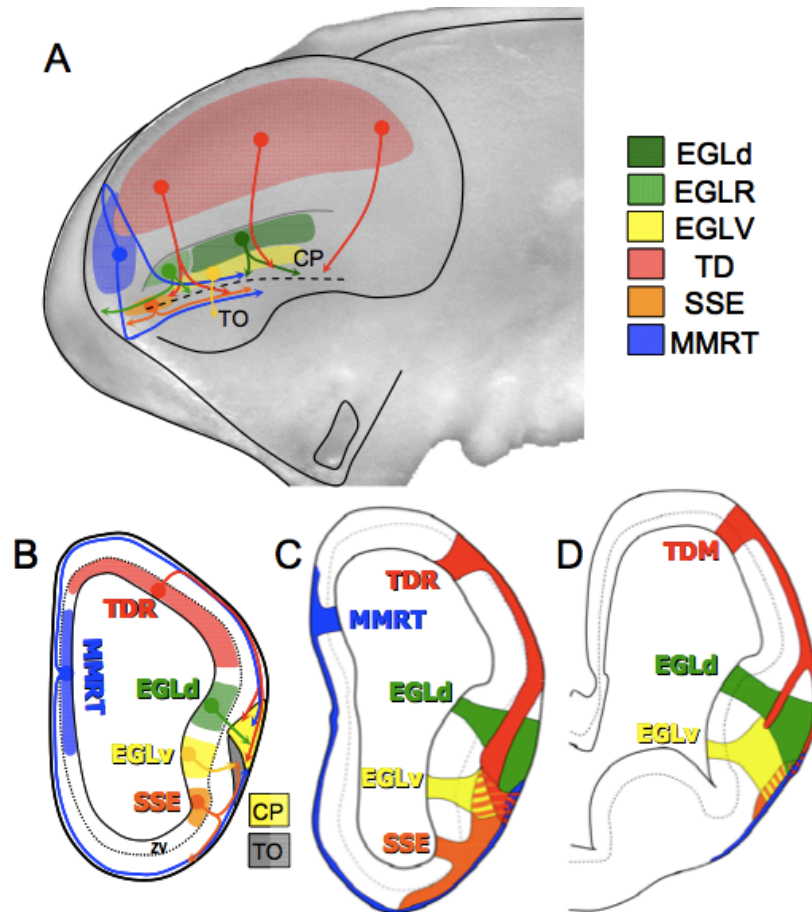
La corteza olfativa se compone de una variedad de estructuras localizadas en la región más ventrolateral del telencéfalo de mamíferos, denominadas: núcleo olfativo anterior, tubérculo olfativo, corteza piriforme, núcleos amigdalinos olfativos y corteza entorrinal (Figura 5). Las proyecciones eferentes desde el bulbo olfativo convergen



**Figura 4.** Figura modificada de Stoykova y col., 2000. Subdivisiones de palio y subpalio y la restricción estructural de los marcadores específicos de cada área. Palio: PM: palio medial; PD: Palio dorsal; PL: palio lateral; PV: palio ventral. Subpalio: EGL: eminencia ganglionar lateral; EGM: eminencia ganglionar medial; Sp: septum. La cabeza de flecha negra indica la frontera entre palio y subpalio.







**Figura 6.** Imagen modificada de García-Moreno y col., 2008. Dibujos representando las diferentes áreas de generación y las rutas migratorias de las poblaciones de células que van a formar la corteza olfativa. (A) Vista lateral del cerebro entero y (B) hemisecciones coronales. MMRT (muro medial rostral telencefálico), TDR (telencefalo dorsal rostral), EGLd (eminencia ganglionar lateral dorsal), EGLv (eminencia ganglionar lateral ventral), SSE (surco septo-eminencial), TDM (telencefalo dorsal medial), CP (corteza piriforme), TO (tubérculo olfativo).

estructuras globosas que emergen en la porción cefálica del tubo neural del embrión en desarrollo, las vesículas telencefálicas. En su formación se pueden distinguir dos etapas claramente diferenciadas, a las que denominamos como estadio de preplaca y estadio de placa cortical. En un principio, este primordio cortical está formado por un neuroepitelio columnar pseudoestratificado, muy fino y aparentemente inactivo. Muy pronto, se empieza a detectar una cierta actividad mitótica en su área germinativa,

también denominada como zona ventricular (ZV), atendiendo a la zona donde se encuentra ubicada, esto es, en la profundidad del neuroepitelio, bordeando los ventrículos laterales. Al mismo tiempo, se empieza a abrir una capa subpial, es decir, debajo de la membrana pial (o piamadre), en la superficie del neuroepitelio. Esta primera capa que se forma en el neuroepitelio recibe el nombre de preplaca (PP), dado que antecede a la aparición de la placa cortical (PC). En la primera de las etapas nombradas, en el estadio de

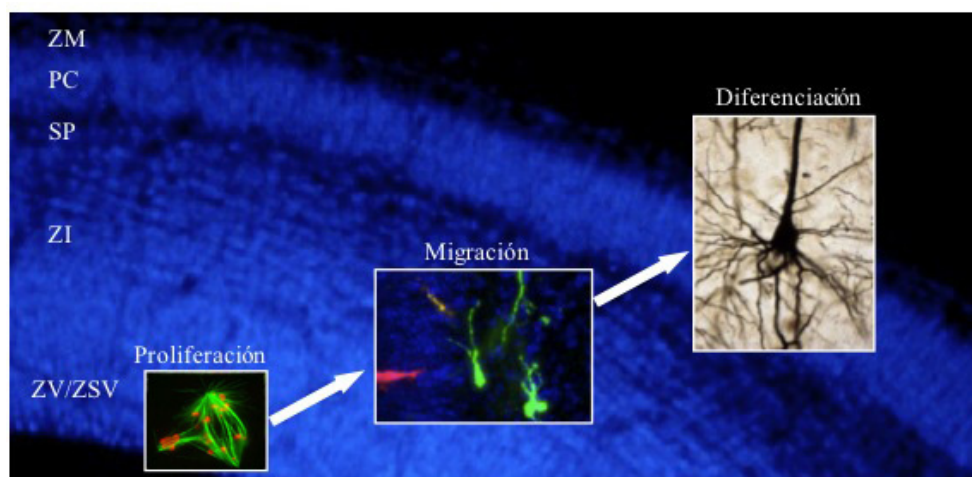


prelaca, el neuroepitelio se encuentra como acabamos de describir: una cierta actividad mitótica en la ZV y una capa externa, subpial, bien formada, denominada PP y poblada por varias poblaciones neuronales fijas o establecidas (por lo menos temporalmente) y una serie variada de poblaciones celulares en tránsito, es decir, en continuo movimiento. Estas poblaciones celulares se desplazan, en trayectorias más o menos largas, para alejarse de su lugar de generación y alcanzar el área donde se asentarán y diferenciarán para formar distintos núcleos o estructuras (Figura 7). Es importante especificar que el modo de desplazamiento utilizado por estas poblaciones tempranas, paralelo a la superficie pial, se denomina migración tangencial, para diferenciarlo del otro tipo de migración cortical descrito, la migración radial.

Aunque podría parecer que la actividad del

neuroepitelio es escasa en el estadio de PP, nada más lejos de la realidad. Diferentes estructuras neurogénicas (algunas conocidas y otras en estudio) mantienen una actividad importante durante esta etapa, de tal modo que la generación de poblaciones celulares es tan abundante que convierten a la PP en una importante autopista surcada por multitud de poblaciones celulares en tránsito, las cuales se desplazan tangencialmente en múltiples direcciones para abastecer distintas áreas. En este sentido, se han descrito que las células generadas en diferentes áreas telencefálicas durante el estadio de PP migran, siguiendo distintas rutas tangenciales, para converger en un área determinada y formar la corteza olfativa (García-Moreno y col., 2008).

En un momento determinado se incrementa seriamente la actividad germinativa de la ZV y se empiezan a generar diferentes poblaciones celulares, como resultado de sucesivas

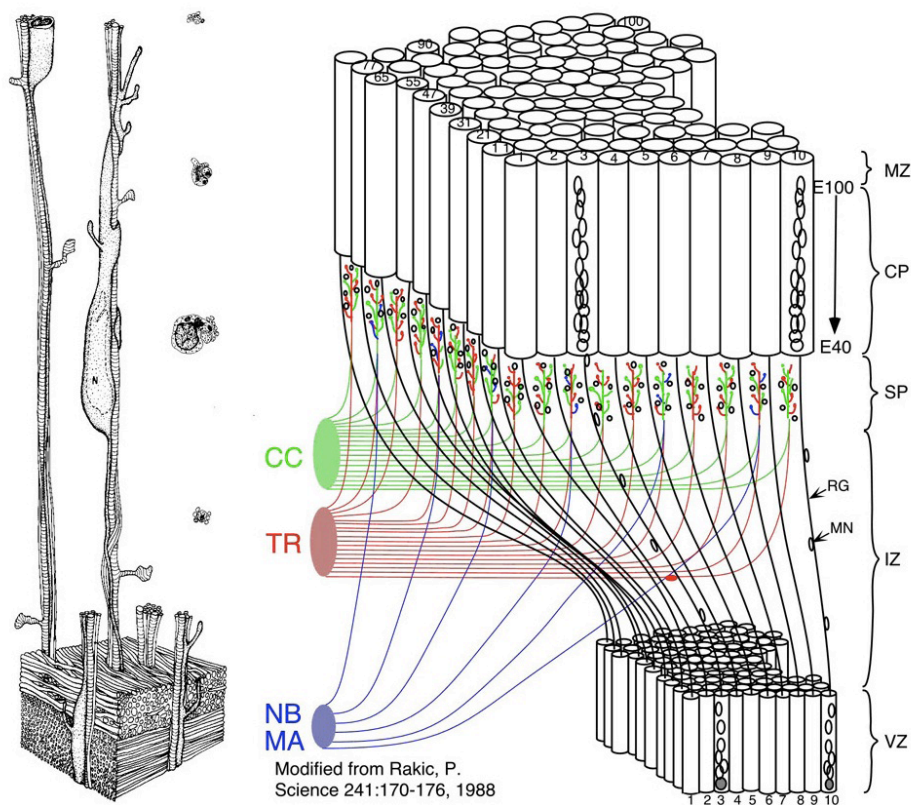


**Figura 7. Esquema del proceso de desarrollo característico del sistema nervioso.** Se ilustran las fases celulares de proliferación, migración y diferenciación, en aposición a una sección coronal de corteza cerebral embrionaria mostrando sus respectivas capas, gracias a una contra-tinción con bisbencimida: zona marginal (ZM), placa cortical (PC), subplaca (SP), zona intermedia (ZI), zona subventricular (ZSV) y zona ventricular (ZV).

## Introducción

oleadas mitóticas. Estas células ascienden hacia la superficie pial, abandonando su lugar de origen en la ZV, deteniéndose en distintos estratos de profundidad del neuroepitelio, utilizando una dinámica de desplazamiento que se ha venido a denominar como migración radial. La principal característica de este tipo de migración es que requiere la presencia de un tipo celular específico, la glia radial. Es ésta, por tanto, una migración gliofílica. Este tipo de glia es temporal, pues aparece en los primeros estadios del desarrollo del sistema nervioso y no se encuentra en el adulto, habiéndose descrito que su desaparición es debida a que se transforman en astrocitos (Hunter y Hatten, 1995). Su morfología es bipolar, anclándose

mediante sus dos procesos en ambas membranas del neuroepitelio (basal y pial). Su cuerpo celular se encuentra siempre en la profundidad del neuroepitelio, en la ZV. Descrita en las últimas décadas del siglo XIX y ampliamente referida en los trabajos de los histólogos clásicos (Van Gehuchten, 1891; Cajal, 1891), no fue hasta 1972 en que Pasko Rakic le atribuyó un importante papel en el desarrollo. Utilizando microscopía de luz y electrónica, demostró cómo las células recién nacidas se unían a la glia radial utilizándola como lianas para ascender hasta el nivel cortical deseado (Rakic, 1972; Figura 8). Actualmente, conocemos una segunda función de esta tipología celular: la glia radial se divide para producir nuevas células gliales,



**Figura 8. Imagen modificada de Rakic, 2003. Disposición de la glía radial.** A la izquierda de la imagen se observan los neuroblastos ascendiendo sobre los procesos gliales radiales.

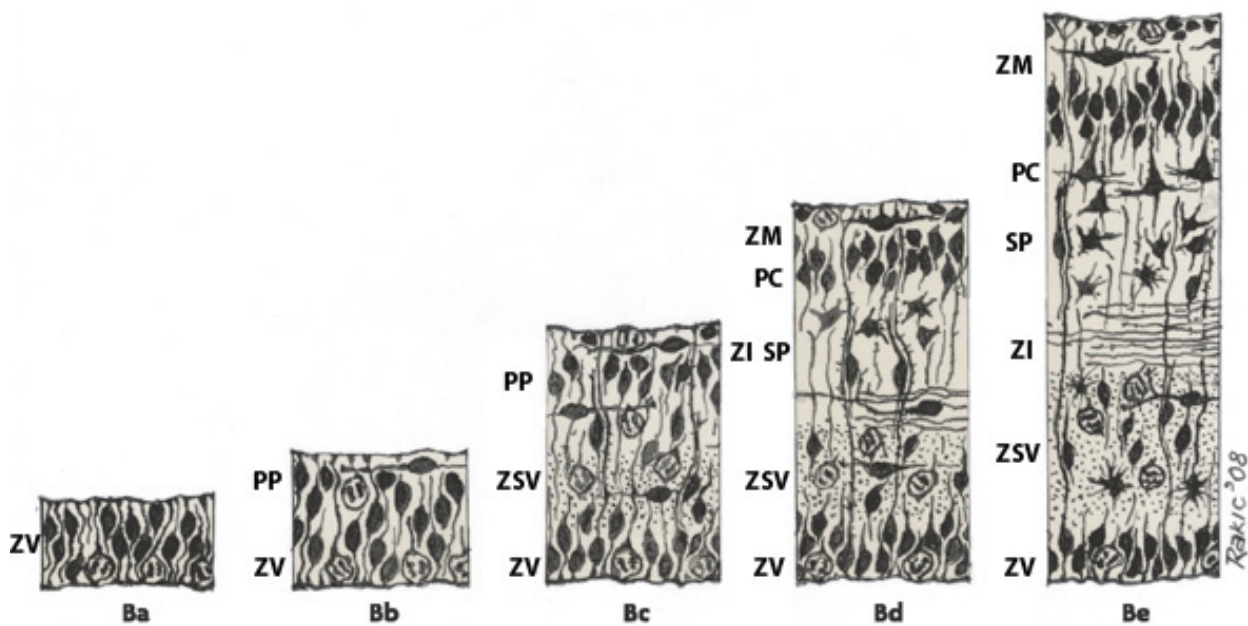
A la derecha se observa el ascenso de las neuronas generadas en la zona ventricular (VZ) colindante a los ventrículos cerebrales embrionarios, y cómo su posicionamiento en la placa cortical es dependiente del andamio de glía radial (transitoria) por la que están trepando.

pero también para producir verdaderas células neuronales (Noctor y col., 2001; Tamamaki y col., 2001). La generación y ascensión de estas células va formando en el neuroepitelio un nuevo estrato denominado placa cortical. Este estrato es importante, pues a partir de él se van a formar las capas 2 a 6 de la corteza cerebral.

Las primeras células de la PC que se forman en la ZV van a ascender radialmente hasta alcanzar la PP. Como recordaremos, la PP estaba colonizada por una serie de poblaciones celulares fijas de generación temprana, entre las que destacamos las células de Cajal-Retzius y las células de la subplaca (SP; Jiménez y col., 2003). Las células de Cajal-Retzius tienen la capacidad de sintetizar y secretar una proteína, la ReIn, a la que se le ha atribuido la función de atraer a las células de la PC, facilitando su desplazamiento radial (Goffinet, 1979). De esta manera, las primeras células generadas de la PC van a alcanzar la PP y, entrando en ella, van a ser capaces de sobrepasar a la población de células de la SP, a las cuales van a ir desplazando hasta dejarlas colocadas en un estrato justo debajo del formado por la PC (Figura 9). De ahí su nombre de estrato de las células de la SP. El estrato que queda por encima de la PC y que alberga la población de células de Cajal-Retzius pasa a denominarse como zona marginal (ZM) y posteriormente

constituirá la capa 1 de corteza cerebral. Durante este estadio de PC se forman las diferentes capas de la corteza cerebral, con un gradiente de dentro a fuera (Angevine y Sidman, 1961). Las primeras oleadas germinativas van a dar lugar a las células de capa 6. Las siguientes van a dar lugar a células de capa 5 que, sobrepasando el estrato de capa 6, se van a colocar por encima de éste. Las siguientes dan lugar a células de capa 4 que ascenderán sobrepasando los estratos de capa 6 y 5... y así sucesivamente, 4, 3, y 2. Recapitulando, la PC va a dar lugar a las capas corticales 2 a 6, encontrándose las células más antiguas (generadas antes) en estratos más profundos y las células más nuevas (generadas en último lugar) en los estratos superiores (Marín-Padilla, 1971; 1978). Durante este estadio, para ayudar a la generación de la PC, aparece otra nueva zona germinativa, que se coloca por encima de la ZV y que llegará a ser bastante más activa que ésta (Rakic y Sidman, 1968); denominada zona subventricular (ZSV).

Durante mucho tiempo se pensó que la corteza cerebral estaba formada exclusivamente por células generadas en las zonas germinativas del neuroepitelio cortical y que alcanzaban su estrato definitivo mediante migración radial. Sin embargo, la existencia de desplazamientos tangenciales era conocida desde antiguo y pudo ser

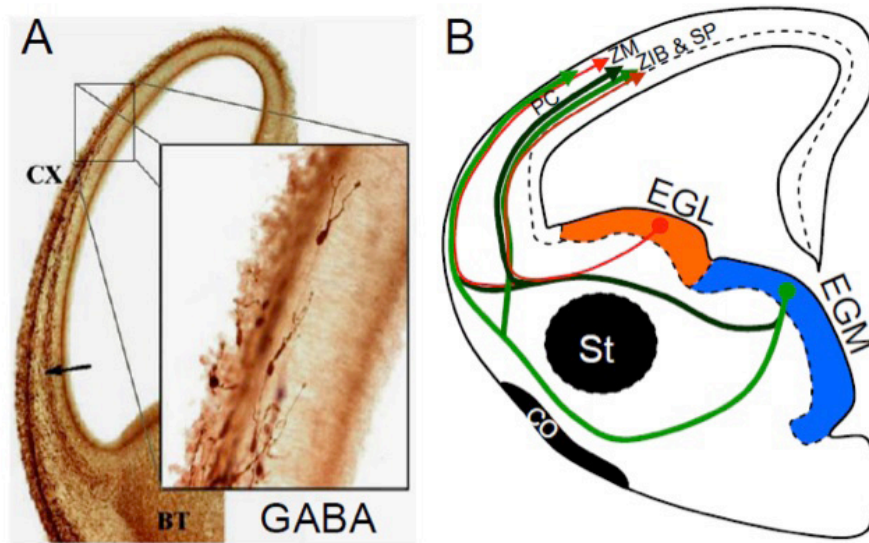


**Figura 9.** Dibujo que representa las distintas fases que acontecen en el desarrollo de la corteza cerebral en humanos. ZV: zona ventricular; PP: preplaca; ZSV: zona subventricular; ZI/SP: zona intermedia/subplaca; PC: placa cortical; ZM: zona marginal. Modificado de Bystron y col., 2008.

demostrada en esta estructura mediante marcajes con retrovirus (Walsh y Cepko, 1988; Price y Thurlow, 1988). No obstante, su descripción e interpretación en aquel tiempo fue bastante pobre, aunque años más tarde fue confirmado, utilizando grabaciones de vídeo, que un 12% de los desplazamientos corticales se realizaban tangencialmente por la zona intermedia (ZI) del neuroepitelio cortical (O'Rourke y col., 1992). Pero no fue hasta 1996 cuando se describió, por primera vez, que la corteza cerebral no está formada exclusivamente por células generadas en el espesor cortical del telencéfalo dorsal (palio), dado que poblaciones celulares generadas desde estadios tempranos del desarrollo en las eminencias ganglionares del telencéfalo basal (subpalio) son capaces de

alcanzar el neuroepitelio cortical siguiendo dos rutas migratorias definidas: la PP y la ZI baja, desplazándose tangencialmente (De Carlos y col., 1996; Figura 10). Desde este momento empiezan a tomar auge las migraciones tangenciales durante el desarrollo y, dado que se había encontrado el origen de las células corticales con este tipo de desplazamiento, su estudio se abordó por numerosos laboratorios. Esto pronto dio sus frutos y un año después se describió que las células subpaliales que entran en el palio eran interneuronas de carácter GABAérgico (Anderson y col., 1997; Tamamaki y col., 1997). Actualmente, se admite que la mayoría de las interneuronas que pueblan la corteza cerebral, se generan en las eminencias ganglionares (lateral, medial y





**Figura 10. Migración tangencial de interneuronas corticales (tomada de De Carlos y García-Moreno, 2009).** (A) Inmunotinción contra GABA en la corteza cerebral (CX) en desarrollo. Las células GABAérgicas se encuentran en disposición perpendicular al eje ventrículo-pia. Se observa que provienen del telencéfalo basal (BT). (B) Dibujo representando las migraciones tangenciales desde las eminencias ganglionares lateral (EGL) y medial (EGM) evitando el estriado en su ascenso a corteza. Se observa que siguen dos vías en su ascenso corteza: la zona marginal (ZM) y la zona intermedia baja (ZIB).

caudal) y entran en esta estructura mediante migración tangencial. De esta manera, todas las células corticales de proyección se generan en las zonas germinativas (ZV, ZSV) del neuroepitelio cortical y se desplazan siempre radialmente (ver revisión en De Carlos y García-Moreno, 2009).

## II. LA SUBPLACA Y SU FUNCIÓN

Como hemos mencionado anteriormente, la SP es una de las capas resultantes, junto con la ZM, de la apertura de la PP. Se denomina subplaca porque colinda con la placa cortical en su parte inferior. Se trata de una de las poblaciones corticales más tempranas, cogenerándose temporalmente con las células de Cajal-Retzius.

Aunque se ha avanzado mucho en los últimos años en el conocimiento del desarrollo de la corteza cerebral, todavía hay numerosos mecanismos que no se conocen bien, como el papel que desempeñan y el origen o destino de ciertas poblaciones celulares. De hecho, si nos fijamos en las células de la SP, vemos que mientras unos autores describen su desaparición al final del desarrollo, y por lo tanto su transitoriedad, otros autores abogan por su permanencia durante la vida adulta. En roedores adultos se puede observar claramente una hilera de células encima de sustancia blanca, bien diferenciadas de la capa 6. Puesto que son animales lisencéfalos, se facilita francamente su observación. Si por el contrario examinamos animales girencéfalos, la cosa se complica, pues las

células de la subplaca quedan embutidas dentro de la sustancia blanca, al aumentar el volumen y plegamientos del tejido. Estas células bien podrían ser las descritas por Cajal (1891) como células intersticiales de la sustancia blanca y que ya vio por primera vez en humanos Meynert en 1867.

Como hemos mencionado anteriormente, en estadio de PP hay un par de poblaciones celulares que se generan más o menos al mismo tiempo y ocupan, sin mezclarse, el mismo estrato, la PP cortical: las células de Cajal-Retzius y las células de la SP. Se ha visto que las primeras proceden de una estructura transitoria durante el desarrollo, situada en el tercio caudal del muro medial telencefálico, el cortical hem, que se puede definir perfectamente por su expresión del gen *Wnt* (Grove y col., 1998). De nuevo encontramos diferentes opiniones en cuanto al lugar de generación de esta tipología celular, pero de acuerdo a los estudios realizados en el laboratorio del Dr. De Carlos (García-Moreno y col., 2007; Ceci y col., 2010) prácticamente toda la población de células de Cajal-Retzius se genera en el cortical hem. Aunque, como decimos, existen laboratorios que se inclinan por otras áreas de origen de esta población celular distintas del cortical hem (como son el septum y el palio ventral; Bielle y col., 2005; Gelman y col., 2009; Gelman y col., 2011). En cualquier caso, desde esta estructura, el cortical hem, las células ocupan toda la superficie palial mediante un desplazamiento

tangencial en sentido caudo-rostral. Pero, ¿qué pasa con la población de células de la SP? Está descrito que estas células se co-generan con las células de Cajal-Retzius (Luskin y Shatz, 1985) y que son las primeras en proyectar fuera del neuroepitelio cortical (De Carlos y O'Leary, 1992), pero, ¿dónde se generan? A día de hoy, no está claramente demostrado. Se cree que se generan en la ZV del neuroepitelio cortical y que alcanzan su estrato subpial mediante migración radial. Sin embargo, existen evidencias de heterogeneidad de esta población neuronal, lo que podría sugerir más de un sitio de generación y por lo tanto se podría hablar de, al menos, un origen dual de la SP.

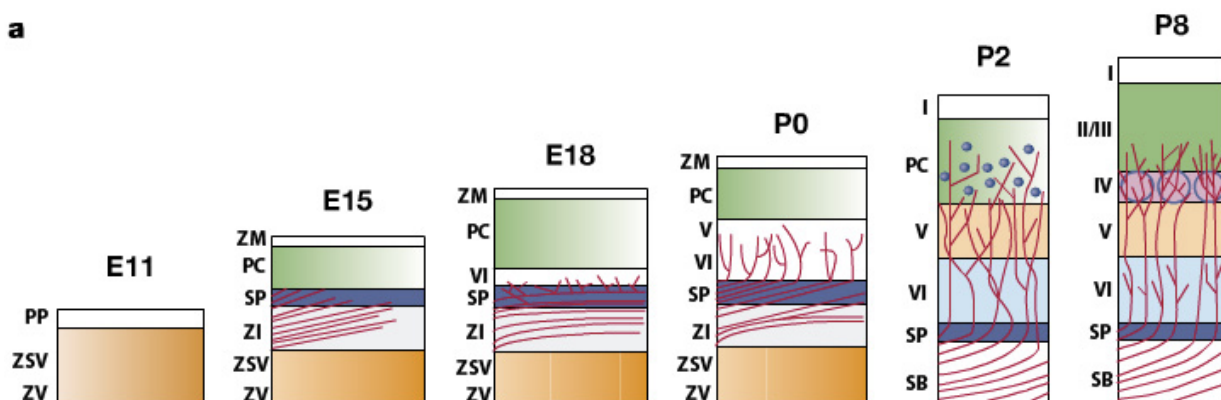
Otro dato conocido es la heterogeneidad de esta población celular. Es por ello que es de obligado planteamiento si esta heterogeneidad fenotípica presenta asociada una amplia paleta de funciones durante el desarrollo. Incluso, en el caso de su persistencia en adulto, ¿cuál es el papel de esta tipología celular en el individuo ya desarrollado? Uno de los papeles iniciales que se le atribuye a la SP es el de conseguir la correcta inervación recíproca tálamo-cortical y cortico-talámica (Ghosh y col., 1990; Ghosh y Shatz, 1994; Molnár y col., 1998). Además, también se le atribuye funciones tales como la formación de las columnas de orientación y dominancia ocular en la corteza visual, la formación de barriles en la corteza somatosensorial e incluso el actuar

como células pioneras marcando el camino a las distintas eferencias corticales (callosas, talámicas y subcorticales en general, a distintas estructuras). Probablemente más allá de estas funciones, aunque no conocidas, las células de la SP tengan otros papeles atribuibles. No obstante, la verdad del asunto es que todas estas funciones no se han demostrado en su totalidad, tratándose la mayoría de ellas de hipótesis de trabajo, por lo que se requieren estudios más serios que aclaren todas estas cuestiones.

Una de las primeras funciones estudiadas de esta población es la de retener en las puertas de una corteza todavía inmadura a los axones tálamo-corticales durante un periodo variable de tiempo (dependiendo de la especie estudiada), antes de su invasión en la placa cortical. Esto fue llamado *waiting period* (periodo de espera; Rakic, 1977). Cuando las distintas áreas corticales se encuentran

preparadas para recibir a los axones talámicos, las células de la SP degeneran, dando fin a este periodo, permitiendo que los axones entren en corteza y se ramifiquen en capa 4 y capa 1 (Figura 11).

Por otro lado, está descrito que las primeras eferencias que salen del neuroepitelio son los axones de células de la SP (De Carlos y O'Leary, 1992), y se les atribuye por algunos autores un papel de células pioneras, de tal modo que serían capaces de guiar hasta su destino a las eferencias cortico-talámicas, cortico-corticales (callosas), y cortico-subcorticales, a distintas estructuras (McConnell y col., 1989). En realidad, pese a adjudicársele un papel generalizado de guía de proyecciones en el desarrollo, los axones de las células de la SP no alcanzan todas las regiones. Así, se ha descrito que no cruzan por el cuerpo calloso, ni alcanzan otras estructuras más allá de los núcleos talámicos (De Carlos y O'Leary,



**Figura 11. Dibujo modificado de López-Bendito y Molnár, 2003. Maduración de la laminación cortical e invasión de las fibras talámicas.** En E15, los axones talámicos alcanzan el área cortical específica que les corresponde y se detienen en el estrato de subplaca (SP, E18), aunque algunos pocos puedan penetrar en la parte más profunda de la placa cortical (PC). En P0 muchas fibras talámicas invaden la PC. PP: preplaca; ZV: zona ventricular; ZSV: zona subventricular; ZI: zona intermedia; ZM: zona marginal; SB: sustancia blanca.

1992). Quizá todo esto contribuya a que, a día de hoy, exista una gran divergencia de opiniones en este ámbito de estudio.

Evidentemente, era de suponer que debería existir una estrecha relación entre las fibras cortico-talámicas (inicialmente establecida por las células de la SP) y las tálamo-corticales, pero en la actualidad, no se conoce con precisión esta relación. Por un lado, algunos autores opinan que estos haces cortico-talámicos, cuando se encuentran a la altura de la cápsula interna con las fibras ascendentes tálamo-corticales, fasciculan y, actuando a modo de soporte recíproco, se guían para encontrar sus dianas específicas. A este mecanismo propuesto se le ha denominado *hand-shake* (“apretón de manos”; Blakemore y Molnár, 1990). En cambio, trabajos de otros autores sugieren que ambos tractos no fasciculan entre sí, sino que simplemente se cruzan a las puertas de la corteza cerebral y participan en el establecimiento de la cápsula interna (De Carlos y O’Leary, 1992). Evidentemente, no por ello se ha de pensar que las células de la SP son innecesarias para la innervación correcta de las fibras tálamo-corticales, dado que existen estudios en los cuales, eliminando física o funcionalmente a las células de la SP, las aferencias tálamo-corticales no alcanzan correctamente su destino. Éste es el caso de un trabajo realizado en el laboratorio de Carla Schatz (Ghosh y col., 1990) en el cual, basándose en que la excitotoxicidad del kainato actúa sólo

a nivel de la SP en estadios tempranos, ponen en evidencia que la eliminación de dicha población celular impide que los axones del tálamo reconozcan su diana en la corteza. Los resultados de este estudio indican que las neuronas de la SP son necesarias para que los axones de núcleo geniculado lateral del tálamo alcancen la corteza visual (occipital), se paren en el estrato de la SP y realicen un “periodo de espera” hasta que la PC este suficientemente desarrollada para, finalmente, entrar en la misma y arborizarse en sus capas diana (principalmente 4ª y 1ª). Pero éste es sólo un ejemplo de los varios trabajos realizados en base a esta temática. Otro modo de alterar la funcionalidad de la SP es modificando su posición, utilizando para ello una estirpe de ratones mutantes, como los ratones Reeler, que son deficientes en la proteína Reln, la cual es secretada por las células de Cajal-Retzius. Esta proteína es necesaria para el correcto posicionamiento de las capas corticales. Éste es el caso de un estudio realizado en el laboratorio de Blakemore (Molnár y col., 1998) en el cual observan qué sucede cuando no existe una división de la PP en dos áreas diferenciadas, la ZM y la SP, encontrándose ésta última, por lo tanto en posición externa, con respecto a la PC, es decir, a las capas corticales 2 a 6. El estudio describe como, las fibras tálamo-corticales, en lugar de llegar y ser retenidas en el estrato de la SP, siguen ascendiendo, penetran en la PC y sólo se paran cuando alcanzan a las células de la SP, que en este



caso, se encuentra en una posición marginal, en la PP no dividida. Ambos trabajos, indican, por lo tanto, la importancia de la existencia de las células de la SP en la correcta innervación por parte de los haces tálamo-corticales.

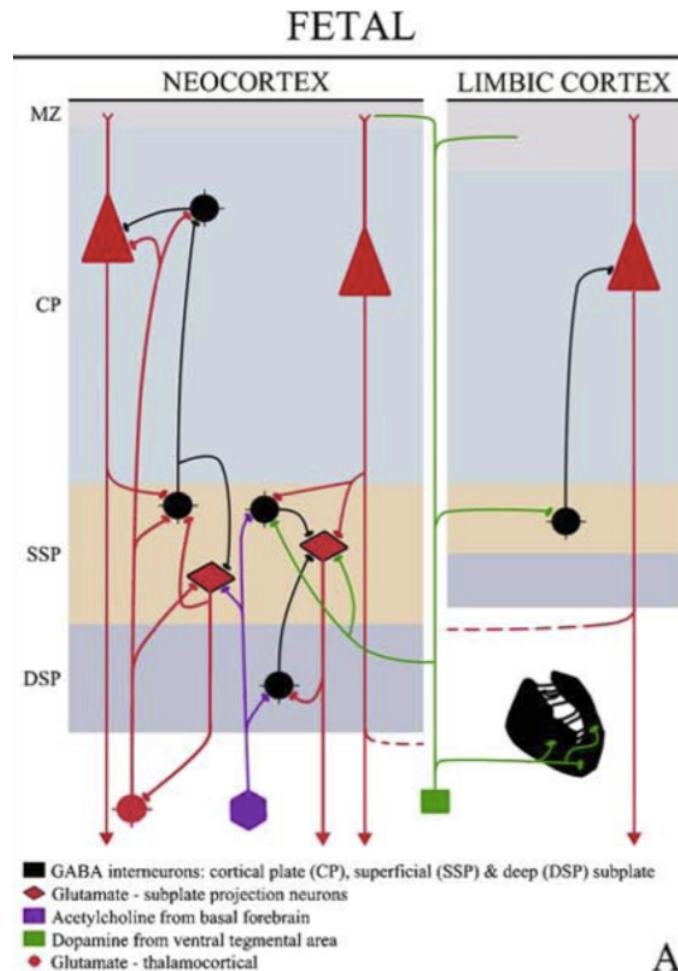
Recientemente, se han realizado estudios electrofisiológicos en los que se demuestra la existencia de contactos sinápticos entre los axones ascendentes de las células de la SP y las células de Cajal-Retzius (Myakhar y col., 2011). En este trabajo se da a entender que neuronas GABAérgicas de la SP inervan a las células de Cajal-Retzius de tal modo que, a pesar de ser ambas estructuras supuestamente transitorias, estas proyecciones muestran ajustes típicos de conexiones sinápticas no transitorias.

Pero en la actualidad siguen existiendo dudas acerca de otras muchas funciones que podría llevar a cabo esta población temprana. En primates, por ejemplo, el hecho de la persistencia de células de la SP a modo de intersticios entre la sustancia blanca cortical, en algunas áreas y no en otras (Kostović y Rakic, 1990), indica que debe existir una funcionalidad de esta población en estadio adulto, no pudiéndose considerar a estas células intersticiales como un simple remanente del desarrollo. Llegamos, por lo tanto, a la siguiente pregunta, ¿cuál es el papel de estas células tras el desarrollo? En la actualidad, siguen siendo preguntas sin respuestas.

### A. TIPOS CELULARES Y PATRÓN DE EXPRESIÓN DE LA SUBPLACA

La SP se compone de poblaciones celulares muy heterogéneas tanto a nivel morfológico como molecular. La zona donde se establecen, se trata de un estrato dinámico que contiene neuronas, células de glía y vasos sanguíneos; además, durante el desarrollo contiene células en migración tanto glutamatérgicas como GABAérgicas (Hevner y Zecevic, 2006; Kanold y Luhmann, 2010). Cabría pensar que si su principal función atribuida (o al menos su función más descrita) es la de guiar a las fibras tálamo-corticales proyectando transitoriamente hacia tálamo, estas células debieran ser en su mayoría células de proyección. Evidentemente, nada más lejos de la realidad, puesto que existe una gran cantidad de interneuronas en este estrato que permanecen en la corteza haciendo contactos cortico-corticales (Figura 12). Un ejemplo de estas interneuronas, aunque probablemente no demasiado común, sería el descrito en el apartado anterior en el que células de la SP contactan con células de Cajal-Retzius.

Por otro lado, se conoce que las neuronas de la subplaca son eléctricamente activas y pueden disparar potenciales de acción durante el desarrollo (Hanganu y col. 2001; Torres-Reveron y Friedlander 2007). Además, parece ser que se incorporan, al menos de un modo transitorio, en la circuitería cortical y subcortical (McConnell y col. 1989; Friauf

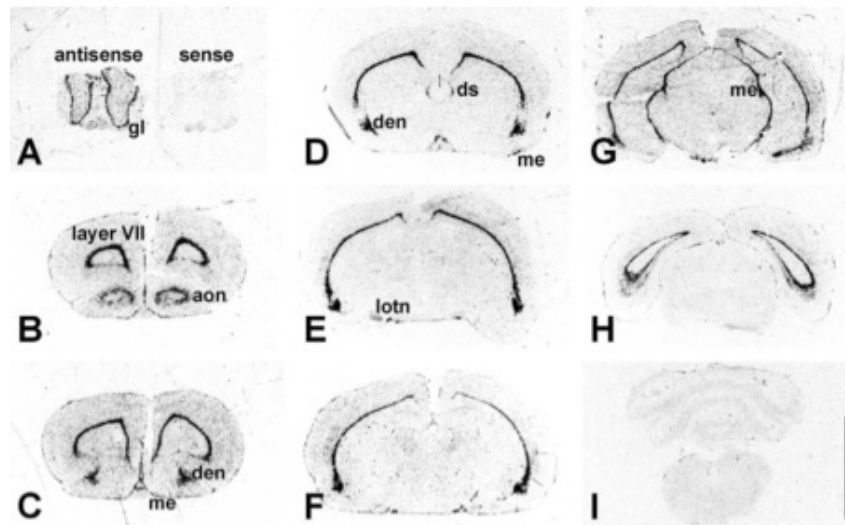


**Figura 12.** Esquema que representa las tipologías celulares características en la subplaca superficial (SSP) y la subplaca profunda (DSP) y sus contactos directos o indirectos con la placa cortical (CP) y la zona marginal (MZ). Modificado de Kostović y col., 2011.

y Shatz 1991; Allendoerfer y Shatz 1994; Higashi y col. 2002, 2005; Kanold y col. 2003).

En la actualidad, hay grupos de investigación que se centran única y exclusivamente en realizar descripciones no sólo anatómicas de la SP, sino también a nivel molecular. Ciertamente es que un buen principio para caracterizar profundamente a una población concreta es observar qué moléculas expresan de manera específica esa población, o más allá, con qué otras poblaciones comparten cierta expresión, dado que con ello se puede inferir una función e incluso un origen. Existen

una serie de marcadores que han sido más estudiados que otros; es el caso del factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF, del inglés: *Connective tissue growth factor*). Se habla del CTGF como un marcador de SP (Heuer y col., 2003) dado que su expresión en corteza se restringe única y exclusivamente a este estrato (Figura 13). Otro marcador específico sería la proteína presináptica complexina 3 (Cplx3). Tanto CTGF como Cplx3 son marcadores que no sólo se expresan en la SP embrionaria sino también en la SP postnatal de ratón (Hoerder-Suabedissen y Molnár, 2013).



**Figura 13.** Figura tomada de Heuer y col., 2003. Muestra la presencia del ácido ribonucleico (ARN) del factor de crecimiento CTGF en secciones coronales de cerebro de ratón adulto. Se observa la especificidad de este factor en subplaca (capa VII), así como en estructuras olfativas: capa de glomérulos (gl) en bulbo olfativo, núcleo olfatorio anterior (aon), núcleo endopiriforme dorsal (den) y septum dorsal (ds).

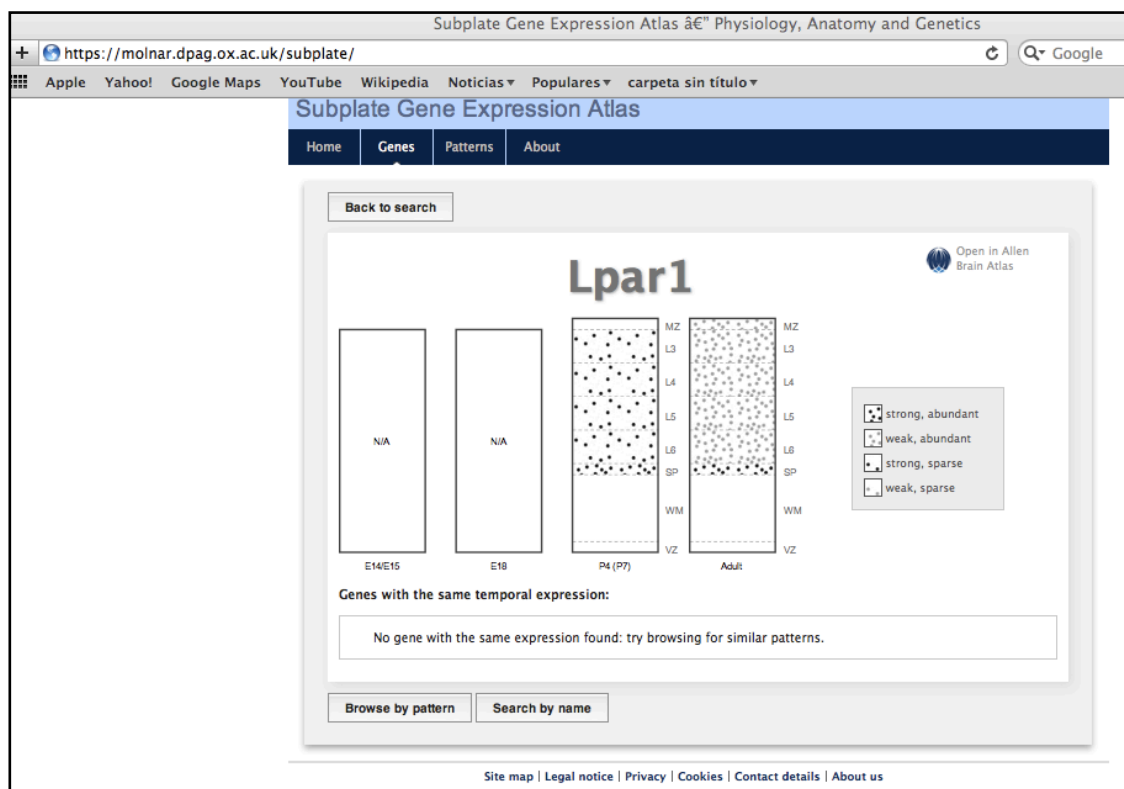
Un marcador no identificado directamente como de la SP, pero que se podría llegar a extrapolar como tal, es el Lpr12/Mig 13a (Schneider y col., 2011). Lo importante de éste es que se encuentra presente antes incluso de que se produzca la apertura de la PP en ZM y SP, pudiendo realizarse, por lo tanto, un seguimiento de esta población celular.

Existen, también, marcadores de subplaca que comparten expresión con otras capas corticales, como es el receptor nuclear Nurr1/Nr4a2 (Liu y Baker, 1999; Arimatsu y col., 2003) o el receptor ácido lisofosfatídico acoplado a proteína G Lpar1/Edg2 (Hoerder-Suabedissen y col., 2013), ambos expresados en capas infragranulares y en SP. Esto nos podría dar a entender un probable punto

en común de función entre poblaciones o incluso de origen embrionario común.

Evidentemente, éstos son sólo unos pocos ejemplos a mencionar de una gran cantidad de marcadores conocidos que se expresan en la SP. Pero los mencionados quizá sean los más representativos de este estrato, dado que no comparten expresión con ninguna otra capa cortical.

Recientemente se ha creado una página web en la que se muestra mediante ilustraciones la expresión de gran cantidad de marcadores de SP y su relación con otras capas de corteza, mostrando incluso la evolución del marcaje a lo largo del desarrollo embrionario y postnatal de ratón (Hoerder-Suabedissen y col., 2013; <https://molnar.dpag.ox.ac.uk/subplate/>) (Figura 14).



**Figura 14.** Página web que ilustra el patrón de expresión de distintos marcadores de subplaca (<https://molnar.dpag.ox.ac.uk/subplate/>). Impresión de la ventana informática que aparece en la búsqueda del gen *Lpar1*.

## B. DESARROLLO DE LA SUBPLACA

Como se ha comentado hasta ahora, las células de la SP junto con las células de Cajal-Retzius son las poblaciones celulares más tempranas que se generan en la futura neocorteza (Luskin y Shatz, 1985; Chun y Shatz, 1989). De hecho, es conocido que la población celular de la SP es la que se genera con anterioridad, hecho demostrado mediante “estudios de proliferación” (Bayer y Altman, 1990).

En la actualidad no existe ningún trabajo que hable de un origen de la SP concreto, dado que se presupone que provienen de la ZV colindante, aunque aparentemente no hay ninguna cita que demuestre este dato. Evidentemente, dada la gran

variabilidad de orígenes y tipos de migración encontrados en otros tipos de poblaciones, se debería presuponer que esta idea es incoherente, máxime, teniendo en cuenta la heterogeneidad de esta estructura. Sin ir más lejos, su población vecina, las células de Cajal-Retzius, también proviene de una estructura lejana y además, extracortical, el cortical hem. Se podría llegar a pensar por lo tanto que estas células de la SP también tienen un origen dual, o múltiple pero, evidentemente, esto a día de hoy debe ser estudiado y demostrado, al igual que la hipótesis contraria de que sólo provienen de la ZV colindante.

Como se ha mencionado en el apartado anterior, existen genes “específicos” de la SP.

Si seguimos la expresión de estos factores a lo largo del desarrollo embrionario, encontraremos, o no, un cambio en el patrón de expresión, de tal modo que podría indicar dos cosas:

- 1) Que existen células que expresan un factor determinado y posteriormente se silencian y pasan a expresarlo otros tipos celulares.
- 2) Que en realidad estas células se encuentren migrando, de tal modo que observemos inicialmente la expresión en un lugar determinado y posteriormente, tras su desplazamiento, en otro lugar diferente.

Pues bien, evidentemente, se podrían utilizar esta serie de marcadores específicos como método de explicación de una de migración, aunque única y exclusivamente a modo de aproximación. Con ello se podría llegar a observar uno o varios orígenes específicos de esta población tan heterogénea. De hecho, en la actualidad se habla o se propone un origen dual de la SP (Montiel y col., 2011), cosa que no sería descabellada a tener en cuenta precisamente esto, que al ser una población heterogénea, tanto funcional como anatómica y molecularmente, podría tratarse asimismo de una población heterogénea ontogénicamente. Lo cierto es que esta hipótesis ya se podía empezar a intuir en 2007 cuando García-Moreno y colaboradores observaron una población celular temprana originada en el MMRT (ya nombrado anteriormente), área palial extra-neocortical, que migraba dorsal y

tangencialmente colonizando la PP. Se pudo pensar que todas éstas eran células de Cajal-Retzius, pero dado que hubo muchas que no expresaban ReIn, se descartó esta idea. Además, debido a la metodología empleada, no se permitió el desarrollo embrionario el tiempo suficiente, y por lo tanto no se pudo observar la apertura de la PP y con ello la aparición visual de la SP colocada debajo de la PC. Todo apunta, por lo tanto, a que en el MMRT se está generando una población distinta pero que coexiste con las células de Cajal-Retzius en la PP. Luego, si se trata de un nuevo origen de la SP es algo que a día de hoy todavía no se encuentra ni mucho menos consolidado.

Ciertamente, dado el papel de ambas, estas células deben generarse antes que las células de la PC, y de hecho, lo hacen. Ahora bien, aunque desconocido en las células Cajal-Retzius, existe una población de células de SP que se genera, al menos en primates, de un modo más tardío en sucesivas oleadas germinativas diferentes a la más temprana (Smart y col., 2002; Lukaszewicz y col., 2005).Cuál es la función de estos siguientes y continuos periodos de generación descritos, se desconoce a día de hoy. Obviamente, se le debería asignar un papel distinto al conocido en la actualidad. Si éstas son las células que sobreviven y se quedan embutidas en la sustancia blanca a modo de remanente, si tienen una función distinta en adulto, etc... de nuevo son datos que a día de hoy se desconocen.



## OBJETIVOS







El objetivo general de este trabajo radica en el estudio de la heterogeneidad ontogénica del telencéfalo, centrándose en el dinamismo poblacional de dos estructuras tempranas: la corteza olfativa y la subplaca neocortical. Este objetivo general se desglosa en los siguientes puntos:

**Objetivo 1. Estudio del modo de maduración y establecimiento de las distintas poblaciones celulares que contribuyen a la corteza olfativa.**

- 1.1. Caracterización de la evolución en la expresión de marcadores específicos (Tbr1, CR, CB y Reln) durante el desarrollo de esta estructura.
- 1.2. Comparativa de la expresión de los marcadores específicos en cada estadio embrionario.

**Objetivo 2. Descripción de las rutas migratorias celulares con origen septal y ventro-palial en distintos estadios embrionarios para determinar la contribución individual de estas áreas proliferativas al cerebro en desarrollo.**

- 2.1. Estudio de la contribución celular septal y ventro-palial a la corteza olfativa.
- 2.2. Estudio de la contribución celular septal y ventro-palial a la corteza cerebral.
- 2.3. Análisis inmunohistoquímico de las contribuciones celulares desde ambos orígenes.

**Objetivo 3. Identificación de las áreas de generación extra e intracorticales de las células de la subplaca.**

- 3.1. Descripción de las poblaciones celulares de subplaca originadas en distintos orígenes telencefálicos.
- 3.2. Caracterización inmunohistoquímica de las poblaciones de subplaca generadas extracorticalmente.



## MATERIALES Y MÉTODOS





### I. ANIMALES

Se utilizaron embriones (n=308) obtenidos de ratonas (*Mus musculus*) gestantes (n=50) wild type C57 y de una cepa transgénica que expresa GFP bajo el promotor de Lpar1, criados en el animalario del Instituto Cajal. Los embriones de esta última cepa fueron obtenidos cruzando hembras *wild type* NIHS (Harlan, Reino Unido) con machos Lpar1-GFP [Tg(Lpar1-EGFP)GX193Gsat, con un fondo NIHS]. El desarrollo embrionario del ratón transcurre durante 19 días. El día de detección del tapón vaginal fue considerado el día embrionario 0 (E0) y el día del nacimiento como E19 o día postnatal 0 (P0).

Los protocolos de manejo y experimentación animal se ajustaron a la normativa Española (R.D. 53/2013 and L.32/2007) y la Directiva de la Unión Europea (2010/63/UE) para el cuidado y uso de los animales de experimentación. El comité de uso y cuidado del animal del Instituto Cajal aprobó todos los procedimientos.

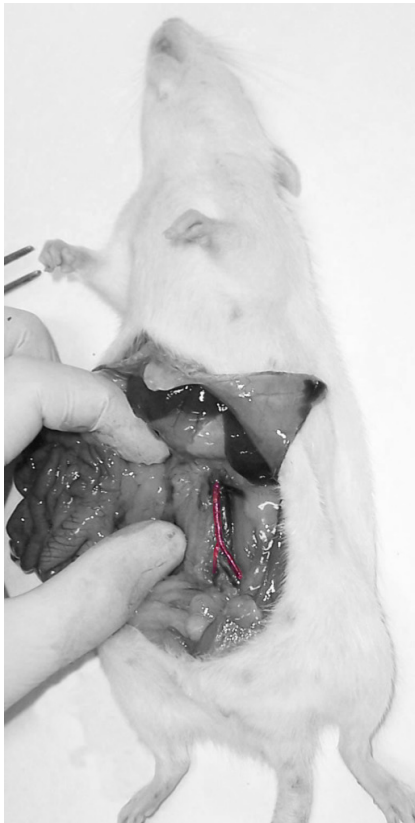
Las ratonas gestantes fueron anestesiadas con Equitesín (3 ml/kg de peso corporal) antes de la cirugía para extraer a los embriones por cesárea a distintos estadios de desarrollo y posteriormente fueron sacrificadas por dislocación cervical. En otros casos, se dejó nacer a los embriones y desarrollarse hasta edades postnatales, para su posterior procesamiento. Los animales que sobrepasaban el día postnatal 5 (P5),

se anestesiaron mediante administración de Equitesín, y los que no llegaban a esta edad, se incluían en hielo para anestesia por hipotermia. Los embriones (en distintas edades embrionarias) fueron utilizados como sigue: 200 fueron inyectados *in utero* con trazadores; 30 fueron extraídos para realizar técnicas inmunohistoquímicas; 78 fueron marcados *exo utero* y cultivados *in toto*.

La supervivencia de los embriones fue del 73% en el caso de los ensayos *in utero* y del 87% en el caso de los ensayos *in toto*.

Todos los animales se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura (23±20C°) y humedad (55-60%), en ciclos de luz/oscuridad de 12/12 horas y alimentados ad libitum con agua y pienso compuesto para roedores.

Con la finalidad de hacer suero de rata para utilizarlo como medio de cultivo, después de inactivar la fracción termolábil del Complemento, en los experimentos de cultivos de embriones completos, se utilizaron ratas wistar (*Rattus norvegicus*) de la casa comercial Harlan. Preferentemente se utilizaron hembras, con un peso entre 250 y 300 gramos, después del parto, dado que es el momento en el cual la sangre materna se encuentra enriquecida en nutrientes. Las ratas a desangrar fueron anestesiadas con la administración de anestesia inhalatoria, mediante éter dietílico (Pancreac; Barcelona, España; Ref. 142770) en una campana de



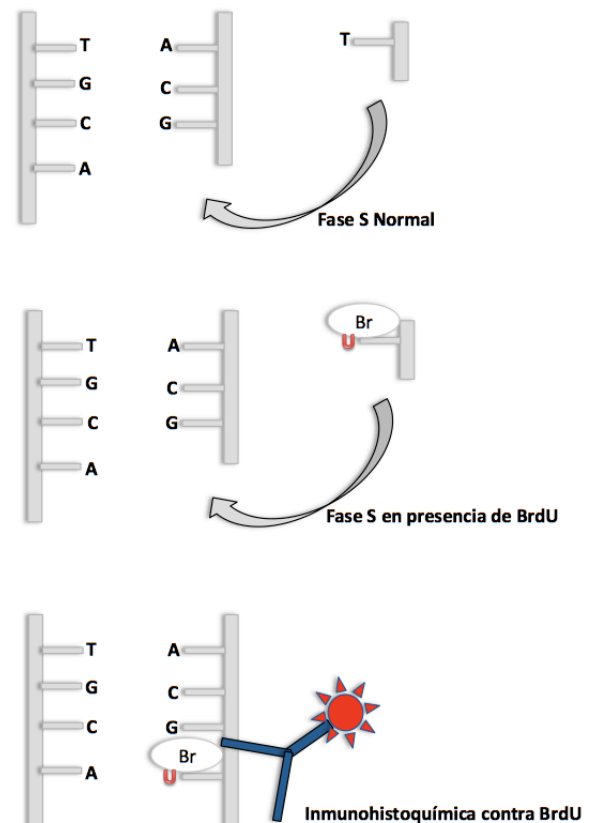
**Figura 15. Localización de la arteria mesentérica.** Laparotomía en rata para acceder a la arteria mesentérica (resaltada en color rojo) de la que se extrae sangre para obtener el suero homólogo utilizado en los cultivos de embriones *in toto*.

crystal por saturación de su atmósfera. El éter es un anestésico fácil de volatilizar del suero extraído a las ratas. Tras la anestesia, se realiza una laparotomía, se desplaza el paquete intestinal y se localiza la arteria mesentérica, de la cual se extrae la sangre arterial (Figura 15).

## II. ESTUDIOS DE PROLIFERACIÓN CELULAR

Varias ratonas gestantes (en estadios E11, E12, E13) fueron inyectadas con una sola inyección intraperitoneal (50 mg/Kg de

peso corporal) de la solución 5-Bromo-2'-deoxiuridina-5'-monofosfato (molécula análoga a la timidina, que se incorpora en el ADN, específicamente durante su síntesis, en la fase-S del ciclo celular, Figura 16) disuelta en tampón estéril Tris-HCl 0.1M (BrdU; Boehringer Mannheim, Indianapolis).



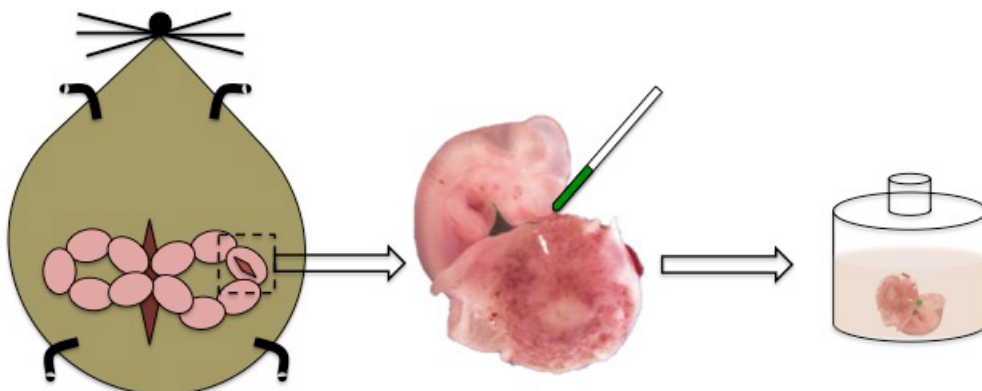
**Figura 16. Esquema que muestra el modo de actuación del BrdU.** En la fase S de la mitosis de las células las distintas hebras de ADN se unen entre si para formar la estructura de doble hélice, mediante la formación de puentes de hidrógeno entre nucleótidos específicos y complementarios. Así, la Guanina (G) se une con la Citosina (C) y la Adenina (A) con la Timidina (T). Pero si en esta fase mitótica se añade el análogo de la Timidina, denominado Uracilo (U), en la forma de bromo-deoxiuridina (BrdU), este compite con la Timidina por su unión a la Adenina y la sustituye. Tenemos de esta manera, el ADN de la nueva célula marcado, pudiendo revelarse con una reacción inmunohistoquímica contra el BrdU.

Los embriones y los ratones postnatales fueron perfundidos transcordialmente con paraformaldehído al 4% (PFA) y postfijados durante la noche a 4°C. Los cerebros fueron cortados en secciones de vibrátomo de 40  $\mu\text{m}$  e incubados en HCl 2N durante 60 minutos, y posteriormente lavados (10 minutos) en tampón borato 0.1M (pH 8.5) para neutralizar el ácido residual. Finalmente, las secciones se marcan con un anticuerpo monoclonal anti-BrdU (0.25  $\mu\text{g/ml}$ ; Roche applied science; Mannheim, Alemania) y visualizado con anticuerpos secundarios conjugados con Alexa.

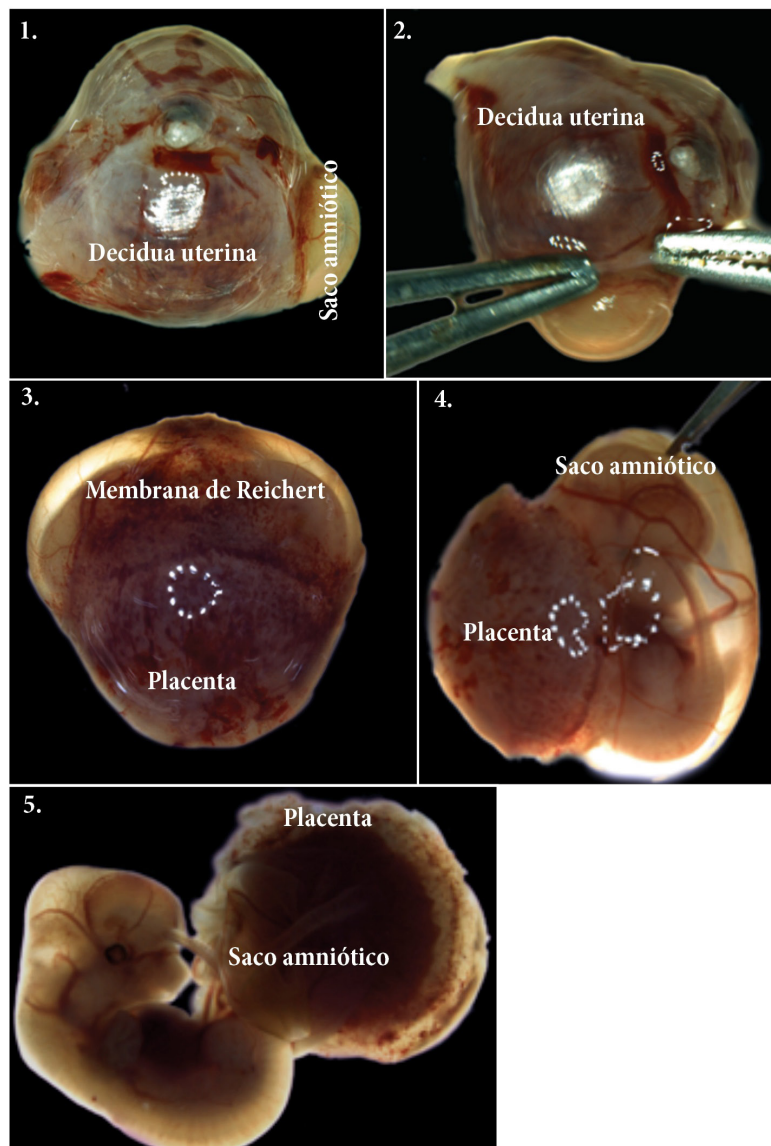
### III. CULTIVO DE EMBRIONES COMPLETOS

Los embriones completos fueron cultivados utilizando un incubador y un sistema de frascos giratorios basado en el protocolo de Cockroft (1990) descrito en detalle en De Carlos y col., 1996 (Figura 17). Brevemente, los embriones de ratón fueron extraídos

del útero y colocados en una placa Petri conteniendo solución equilibrada de Hank (HBS) a 37°C bajo condiciones estériles. La pared muscular y la decidua fueron extraídas, y la membrana de Reichert fue abierta para mostrar el saco amniótico vascularizado que contiene al embrión en su interior. Teniendo cuidado de mantener la integridad de las venas y arterias vitelinas, el lado menos vascularizado del saco amniótico fue parcialmente abierto para exponer al embrión, dejándole unido a sus membranas y placenta (Figura 18). Los trazadores (ver más adelante) fueron inyectados con la ayuda de un microscopio de disección (Nikon SMZ1500) y un dispositivo de inyección a presión (Picospritzer, General Valve). A continuación, los embriones inyectados fueron transferidos uno a uno, a un frasco de cristal conteniendo 4 ml de medio de cultivo. Estos frascos se colocan en un rotor especial, que es hueco con motivo de poder suministrar a través de él una mezcla gaseosa apropiada (95%  $\text{O}_2$ , 5%  $\text{CO}_2$ ) y a la vez mantener en rotación



**Figura 17. Dibujo representando las tres fases básicas del cultivo de embriones enteros: 1) Extracción.** A la ratona gestante se le realiza una laparotomía para acceder a los cuernos uterinos, de los que se extraen uno a uno los embriones. **2) Inyección.** Se realiza el trazado celular mediante inyección de marcadores. **3) Cultivo.** Se realiza en un frasco conteniendo suero homólogo, sujeto a un rotor que los mantiene a 33 rpm, con una oxigenación y temperatura adecuadas.



**Figura 18. Pasos de la extracción del embrión para su posterior cultivo.** 1. Embrión cubierto de la capa muscular uterina y capas extra-embionarias. 2. Con ayuda de unas pinzas de relojero se le libera del útero y decidua. 3. Con ello se obtiene al embrión dentro del saco amniótico y envuelto por la membrana de Reichert (4). 4. Evitando los vasos, se procede a la apertura del saco amniótico y el amnion. 5. Finalmente se obtiene al embrión unido, mediante los vasos vitelinos, al saco amniótico y a la placenta.

los frascos de cultivo (33 rpm). Este rotor se coloca dentro de un pequeño incubador, donde manteniendo la temperatura a 35°C, se incuban los embriones durante uno o dos días. Los embriones fueron cultivados en un medio constituido con suero de rata obtenido por centrifugación (100 g x 5 min, 3

veces) de la sangre inmediatamente después de su extracción y al que posteriormente se le ha inactivado la fracción termolábil del Complemento. Este suero fue filtrado, antes de su uso, con Filtropur S 0.45 (Sarstedt, Nümbrecht) y suplementado con 1 mg/ml de glucosa y antibiótico (penicilina-

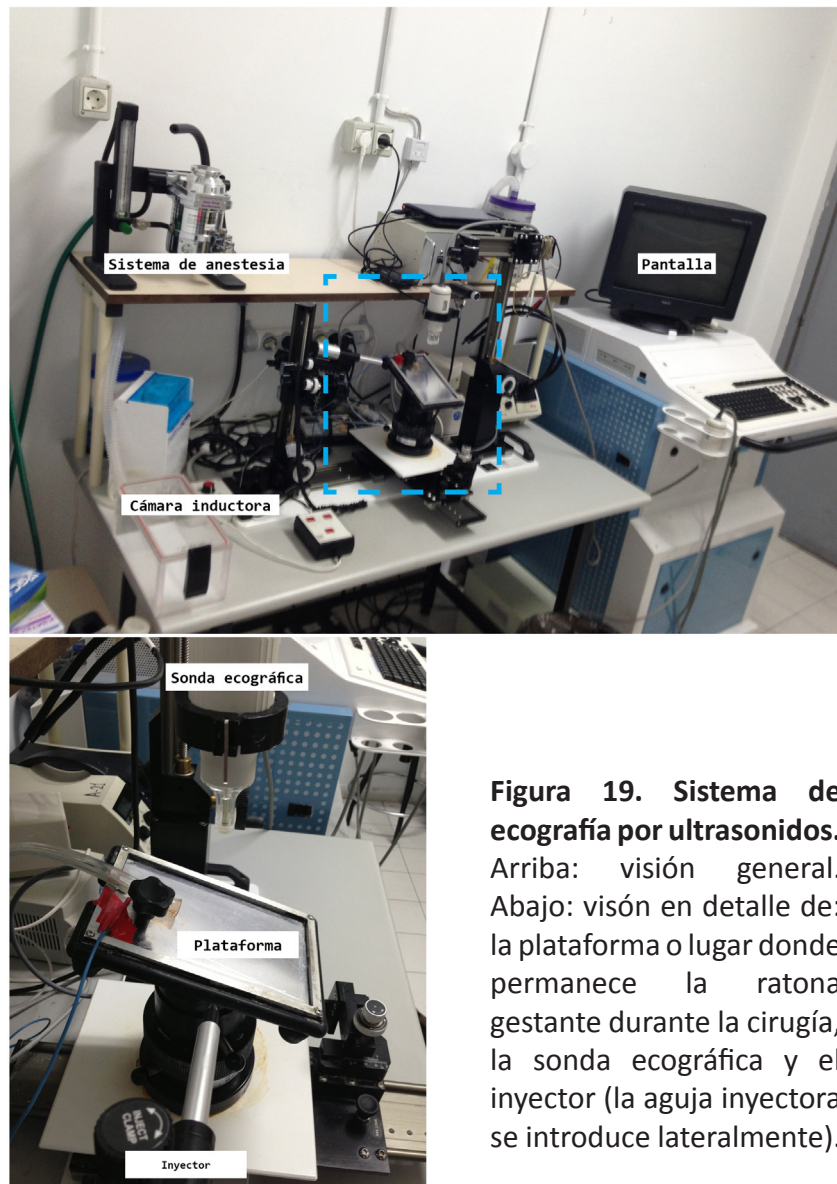


estreptomycin a, 100 IU/ml; Gibco, Grand Island, NY).

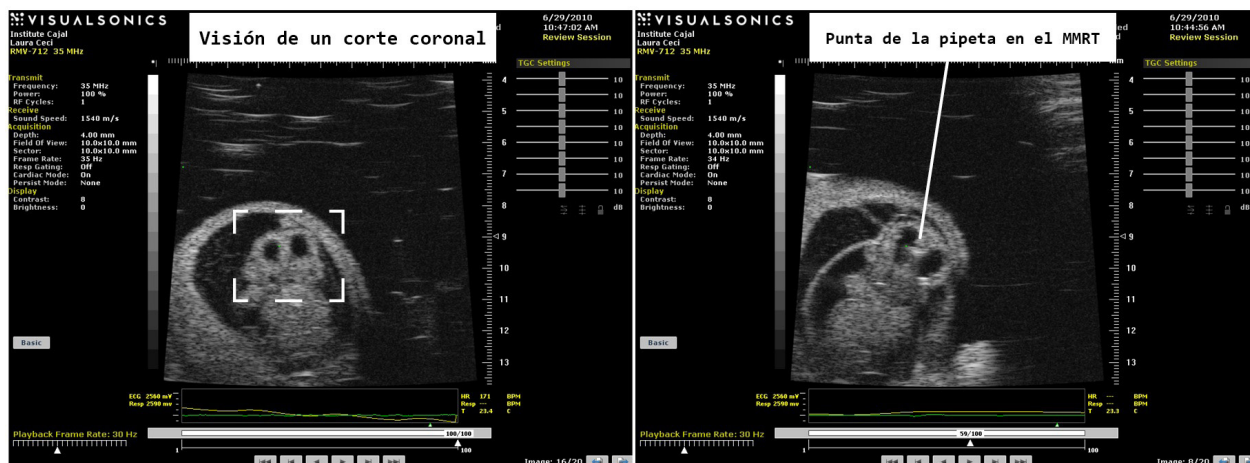
#### IV. EXPERIMENTOS INTRAUTERINOS

Los embriones fueron inyectados intra-útero con el fin de marcar específicamente nuevas poblaciones celulares generadas en el momento y lugar deseados, para lo cual se utilizó un sistema de inyección guiado por ultrasonidos, VeVo 770® (VisualSonics Inc.

Toronto, Canadá) (Figura 19). Brevemente, las ratonas gestantes (E11-E13) fueron anestesiadas con isoflurano (Isova vet, ref. 240055; Centauro, Barcelona, España), los cuernos uterinos fueron expuestos fuera de la cavidad abdominal y cubiertos con gel de ultrasonidos previamente calentado (Parker Laboratories, Inc. NJ, EE.UU.). Utilizando un micro manipulador y gracias a la visualización de los embriones en la pantalla del ecógrafo (Figura 20), las diferentes áreas de interés



**Figura 19. Sistema de ecografía por ultrasonidos.** Arriba: visión general. Abajo: visión en detalle de: la plataforma o lugar donde permanece la ratona gestante durante la cirugía, la sonda ecográfica y el inyector (la aguja inyectora se introduce lateralmente).



**Figura 20.** Pantalla del ecógrafo visualizando un embrión de 11 días. Recoge una sección coronal bastante rostral. Se observa la punta de la pipeta de inyección sobre el muro medial rostral telencefálico, una estructura muy estudiada en la presente tesis.

en desarrollo fueron inyectadas con un volumen total de 23 nl de trazador, o 1-2  $\mu$ l de la solución de plásmido recombinante en el ventrículo lateral, después de lo cual los embriones fueron electroporados. Finalmente, el gel de ultrasonidos fue eliminado para volver a introducir los cuernos uterinos en el abdomen. Tras la cirugía, el antibiótico enrofloxacin (5 mg/kg; Baytril; Bayer, Leverkusen, Alemania) y el anti-inflamatorio ketorolac (300  $\mu$ g/kg; Droal; VITA Laboratories, Barcelona, España) fueron administrados a las ratonas gestantes. A los embriones inyectados se les permitió la supervivencia hasta estadios más tardíos o postnatales.

## **V. TRAZADORES E INYECCIONES**

Los siguientes trazadores fueron utilizados en este estudio:

1) Cristales, o una solución 2.5%, (en DMF; N-dimetil formamida, Sigma, Ref. D4254) de 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetra-metil-indocarbocianina perclorato (DiI, Molecular Probes, Eugene, OR, EE.UU). El DiI es una molécula lipofílica de la familia de las carbocianinas. Se trata de un marcador fluorescente de color rojo que marca la membrana plasmática no siendo tóxico para la célula. Difunde a través de los lípidos de la membrana y puede actuar tanto por transporte retrógrado como anterógrado.

2) Solución 10 mM de carboxi-fluoresceína diacetato succinimidil ester (CFDA SE; de 557 de peso molecular; Molecular Probes, Ref. 154938). Es un colorante que difunde al interior de las células, volviéndose fluorescente cuando los grupos acetato son eliminados por esteresas intracelulares. Se trata de un trazador celular verde.

### 3) Construcciones de Retrovirus incorporando GFP.

Los cristales de Dil fueron empleados en tejido fijado, introduciéndolos en el borde palio-subpalio para marcar la cápsula interna. El CFDA, los retrovirus, o la solución de Dil fueron inyectados en distintas áreas germinativas telencefálicas para trazar sus linajes celulares durante el desarrollo embrionario.

## VII. SÍNTESIS DE RETROVIRUS

Para transfectar de un modo estable las

células en división con la proteína verde fluorescente (GFP), los vectores retrovirales derivados de la leucemia murina Moloney, fueron utilizados con los vectores de empaquetamiento pCLEco y el pBabe IRES-GFP (cedidos por Dr. Susana Gonzalo, Saint Louis University, St. Louis, Mo; Morgenstern y Land, 1990). Todo el proceso de producción de retrovirus se realizó en una cabina de bioseguridad 2 (P2; Figura 21).

Los virus fueron producidos por una co-transfección transitoria de los dos plásmidos en células de la línea 293-T en medio reducido de suero Opti-MEM (GIBCO, Scotland-UK) utilizando el agente de transfección FuGene HD (Roche, Mannheim-Alemania, 04 709 705 001) con una proporción de 8



Figura 21. Cabina de flujo laminar; bioseguridad 2 (P2), utilizada para la producción de virus.



μl de FuGene HD®: 2 μg de cada uno de los vectores. El sobrenadante de las células 293-T transfectadas que contienen el retrovirus, fue recogido tras 12 y 24 horas, concentrado dos veces a 22000 rpm durante 2h a 4°C y almacenado a -80°C en PBS con 10% de BSA. El título viral fue determinado 3 días después de la infección de las células 3T3 mediante citometría de flujo basada en la expresión de GFP, y la unidad de transducción por ml obtenido varió entre  $0.4 \times 10^8$  –  $2.6 \times 10^8$ .

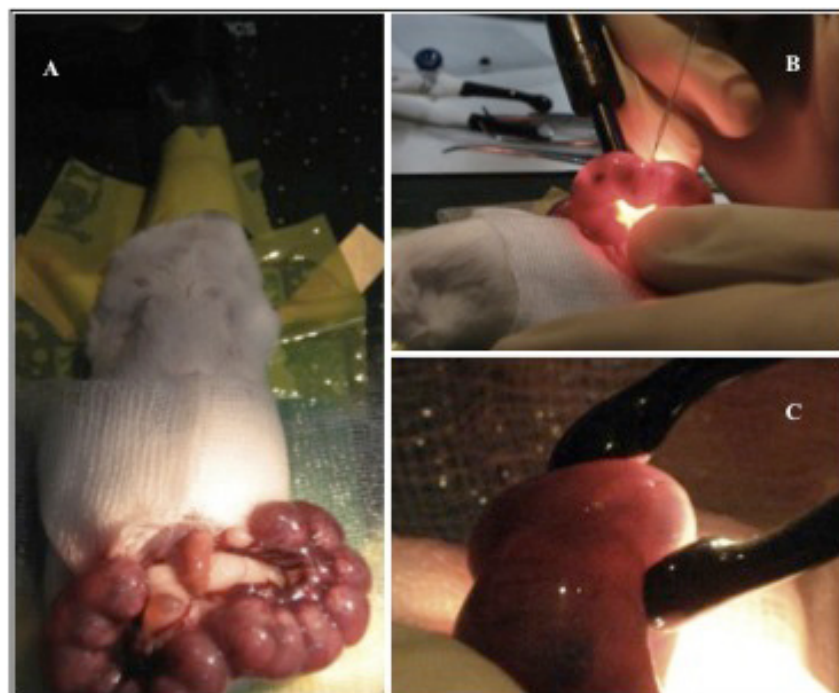
### VIII. ELECTROPORACIONES

Las distintas áreas en desarrollo telencefálicas fueron transfectadas *in utero* utilizando un electroporador BTX ECM 830 (BTX; Massachusetts, EE.UU). La electroporación se

llevó a cabo en 5 pulsos (50 ms) descargando un condensador de 500 μF cargado de 25 V con una fuente de alimentación en secuencia. El pulso de voltaje fue descargado a través de un par de placas redondas de platino (5 mm de diámetro) situadas en cada lado del embrión a través del útero (Figura 22). Los plásmidos utilizados en este estudio fueron pPB-Ubc-EGFP y mPBase (trasposasa), cedido por el profesor Bradley (plásmido descrito en Yusa y col., 2009). El plásmido GFP contiene regiones específicas que son reconocidas por la trasposasa, permitiendo su integración en el genoma.

### IX. INMUNOHISTOQUÍMICA

Reacciones inmunohistoquímicas sencillas



**Figura 22. Inyección y electroporación *in utero*.** A. Laparotomía y exposición del útero bicornue de la ratona gestante. B. Mediante transiluminación con luz fría se observa el encéfalo del embrión y sus cavidades, permitiéndose la Inyección del plásmido-GFP en los ventrículos laterales. C. Electroporación con electrodos circulares en pinza.

o dobles fueron realizadas en esta tesis utilizando los siguientes anticuerpos primarios:

- Conejo-anti-Calbindin-D28K (CB; Swant; Bellinzona, Suiza; CB38; 1:10000)
- Conejo-anti-Calretinin (CR; Swant; 7699/4; 1:2000)
- Conejo-anti-Complexin3 (Cplx3; ProteinTech; Chicago, Illinois; 16949-1-AP; 1:100)
- Conejo-anti-GABA (Sigma; St. Louis, Missouri; A-2052; 1:1000)
- Conejo-anti-PDGFRalfa (Santa Cruz; Dallas, Texas; Sc388; 1:300)
- Conejo-anti-Tbr1 (Chemicon; AB9616; 1:1000)
- Rata-anti-GFP (Nacalai Tesque; Kyoto, Japón; 04404-84; 1:2000)
- Ratón anti-BrdU\* (G3G4 IgG1, isotipo de la cadena ligera kappa, desarrollado por Stephen J. Kaufman y obtenido por el Developmental Studies Hybridoma Bank, desarrollado bajo los auspicios de NICHD y mantenido por la Universidad de Iowa; 1:2000)
- Ratón-anti-NeuN (Chemicon; Temecula, California; MAB377; 1:300)
- Ratón-anti-Relina (Chemicon; MAB5364, Clone G10; 1:1000)
- Ratón-anti- $\beta$ -Tubulina clase III (TuJ1; Chemicon; MAB1637; 1:1000)

\*Para visualizar la incorporación de BrdU, se necesitó un tratamiento con HCl durante 30 minutos para hacer al epítipo accesible al anticuerpo primario.

Los anticuerpos secundarios utilizados en esta tesis fueron:

- Alexa 568 Cabra Anti-Conejo IgG (Molecular Probes; A11011; 1:2000)
- Alexa 488 Cabra Anti-Conejo IgG (Molecular Probes; A11008; 1:2000)
- Alexa 568 Cabra Anti-Ratón IgG (Molecular Probes; A11004; 1:2000)
- Alexa 488 Cabra Anti-Ratón IgG (Molecular Probes; A11001; 1:2000)
- Alexa 488 Anti-Rata (Molecular Probes; A11034; 1:2000)
- Alexa 633 Estreptavidina (Molecular Probes; S21375; 1:2000)
- Cabra Anti-Conejo biotinilado IgG (Vector Laboratories; Burlingame, California; BA-1000; 1:2000)
- Cabra Anti-Ratón biotinilado IgG (Vector Laboratories; BA-9200; 1:2000)

Todos los anticuerpos secundarios fueron disueltos en tampón fosfato con Tween (PBT), conteniendo 5% de suero normal de cabra (NGS) y 0.1% de albúmina de suero bovino (BSA).

Las secciones fueron incubadas con el

anticuerpo primario disuelto en la misma solución de bloqueo toda la noche a 4°C. Tras lavar con PBT, las secciones fueron incubadas con el anticuerpo secundario durante 2 horas. Para la inmunohistoquímica de Relina, las secciones fueron tratadas con tampón citrato frío (pH 6) durante 5 minutos y con citrato a 90°C durante 1 minuto. Para todos los anticuerpos, una serie de secciones fueron usadas de control, donde el anticuerpo primario fue omitido, no observándose marcaje inespecífico. Finalmente, las secciones fueron contra-teñidas con bisbencimida y montadas en portaobjetos gelatinizados.

En el caso de las secciones provenientes de cerebros en los que se había realizado una inyección de Dil, no se pueden realizar inmunohistoquímicas utilizando detergentes ya que este marcador se pierde debido a que se comprometen la integridad de las membranas. Por lo tanto se realiza una inmunohistoquímica utilizando digitonina (300411; Calbiochem, La Jolla, California, USA) como alternativa al PBST tal y como se detalla a continuación:

\* La digitonina se almacena en dimetil sulfóxido (DMSO) a una concentración de 50 mg/ml a -20°C.

- Solución de bloqueo: 2% DMSO, 3% BSA, 1mg/ml de digitonina en PBS 1X de 2 a 8 horas a 4°C.

- Anticuerpo primario: en solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C.

- Tres lavados rápidos a temperatura ambiente en PBS (de 5 minutos cada uno).

- Varios lavados a 4°C durante todo el día.

- Anticuerpo secundario en 0,5mg/ml de digitonina en PBS durante la noche a 4°C.

- Tres lavados rápidos a temperatura ambiente en PBS (de 5 minutos cada uno).

- Varios lavados a 4°C.

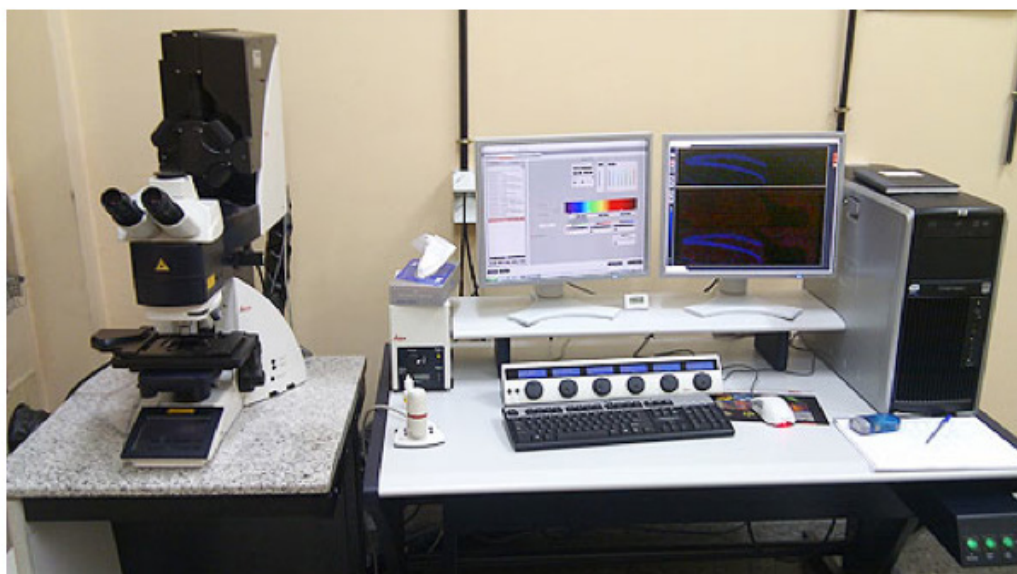
## **X. ADQUISICIÓN DE LA IMAGEN**

Las imágenes de cerebros enteros y de secciones fueron adquiridas utilizando tanto un microscopio de disección de fluorescencia (Leica MZFL-III) como un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse E600) equipados con una cámara digital (Nikon DMX 1200F) o un microscopio confocal (Leica TCS 4D; Figura 23). Todas las fotografías fueron ajustadas equitativamente para el contraste y el brillo utilizando el programa Adobe Photoshop CS6 (Adobe, San José, California).

## **XI. ANÁLISIS DE COLOCALIZACIÓN**

El porcentaje de células que aparecieron doblemente marcadas al usar distintos marcadores fue cuantificado en imágenes de microscopia confocal tomadas cada 2 µm a partir de una sección de vibrátomo de 40 µm, utilizando el programa Cell Calculator (Universidad de Sheffield) para el programa Image J. Se emplearon ratones postnatales inyectados en E11 (y sacrificados: 4 a P0, y

LEICA DMI6000B OBJETIVOS	LINEAS LASER DE EXCITACIÓN	SOFTWARE DE ADQUISICIÓN	OTROS ACCESORIOS
10X 0.40 DRY	405	LEICA LAS AF	PLATINA MOTORIZADA
20X 0.70 DRY	458, 476, 488, 496, 514		
40X 1.25 IMM OIL	561		
63X 1.40 IMM OIL	633		
100X 1.30 IMM OIL			



**Figura 23.** Microscopio confocal Leica TCS 4D, utilizado en la realización de esta tesis. Imagen tomada del Servicio de microscopía del Instituto Cajal (CSIC).

8 a P8) provenientes de distintas camadas. Se contabilizaron las células de tres secciones de cada cerebro. Tras contabilizar la colocación, los datos se compararon mediante ANOVA.

## XII. SOLUCIONES COMUNMENTE UTILIZADAS

A continuación se detallan los componentes y preparación de las soluciones comúnmente utilizadas en esta tesis.

### Equitesín (anestésico)

Se mezclan los siguientes componentes:

Pentobarbital (Nembutal): 0,97 g

Alcohol 900: 11,5 ml

Hidrato de Cloral: 4,5 g

Propilenglicol: 42,8 ml

Sulfato de Magnesio: 2,12 g

Agua destilada: 45,7 ml

### Líquido de Hank

8 g de ClNa; 0,4 g de ClK; 0,14 g de Cl<sub>2</sub>Ca; 0,1 g de Cl<sub>2</sub>M (6H<sub>2</sub>O); 0,1 g de SO<sub>4</sub>Mg(7H<sub>2</sub>O);

0,06 g de  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ ; 0,06 g de  $\text{PO}_4\text{HNa}_2(\text{H}_2\text{O})$ ; 0,35 g de  $\text{CO}_3\text{HNa}$ ; 1 g de Glucosa. Se disuelve en 1000 ml de agua destilada y desionizada. Calibrar el pH a 7,2 y filtrar (0,22  $\mu\text{m}$ ; Stericup; Millipore; SCGPU05RE).

### Tampón fosfato (PB) 0,1 M

Se mezclan 21,9 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y 6,35 g de  $\text{H}_2\text{NaPO}_4$  con agua destilada, llevándolo a un volumen final de dos litros.

### Paraformaldehído al 4% en PB 0,1 M

Se prepara mezclando en el momento de su uso partes iguales de una solución de paraformaldehído al 8% en agua destilada y PB 0,2 M. La receta del PB 0,2 M consiste en la mezcla de 21,9 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y 6,35 de  $\text{H}_2\text{NaPO}_4$  con agua destilada llevándolo a un volumen final de un litro.

### Agar para bloques del vibrátomo

Se mezclan 3,5 g de agar-agar tipo europeo (Panreac) con 8 g de sacarosa, enrasando a 100 ml con agua destilada. Esta mezcla se calienta hasta su ebullición al baño maría. Después se deja enfriar y se conserva a 4°C.

### Tampón fosfato salino (PBS)

8,2 g de NaCl; 0,2 g de KCl; 0,2 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y 1,14 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  enrasado a un litro de agua destilada y ajustando su pH a 7,4 con NaOH.



## RESULTADOS





## **I. EVOLUCIÓN EN EL PATRÓN DE EXPRESIÓN DE DISTINTOS MARCADORES DE LA CORTEZA OLFATIVA A LO LARGO DEL DESARROLLO EMBRIONARIO**

A lo largo del desarrollo embrionario del sistema nervioso, el patrón de expresión de los distintos marcadores no es estático, de tal modo que la aparición de cada uno de ellos no se restringe a un área determinada, sino que varían en el espacio y en el tiempo.

Teniendo en cuenta la heterogeneidad ontogénica previamente descrita en la corteza olfativa, con el aporte celular por parte de distintas áreas proliferativas, no es descabellado pensar que, distintos marcadores supuestamente “específicos” de esta estructura, presenten un patrón de expresión variable. Por lo tanto, con la finalidad de analizar la expresión espacio-temporal de diferentes proteínas durante el desarrollo de la corteza olfativa, se llevaron a cabo técnicas inmunohistoquímicas contra los siguientes marcadores conocidos: Tbr1, CR, CB y Reln, en ratones de estadios E12, E14, E18 y en el adulto.

### **A. EXPRESIÓN DE TBR1 DURANTE EL DESARROLLO DE LA CORTEZA OLFATIVA**

En el estadio embrionario más temprano seleccionado, E12, se observó una expresión significativa de Tbr1 en las áreas rostral y caudal de la corteza piriforme (CP; Figura 24 A,B) y en la zona del manto de la eminencia ganglionar lateral (EGL), pero

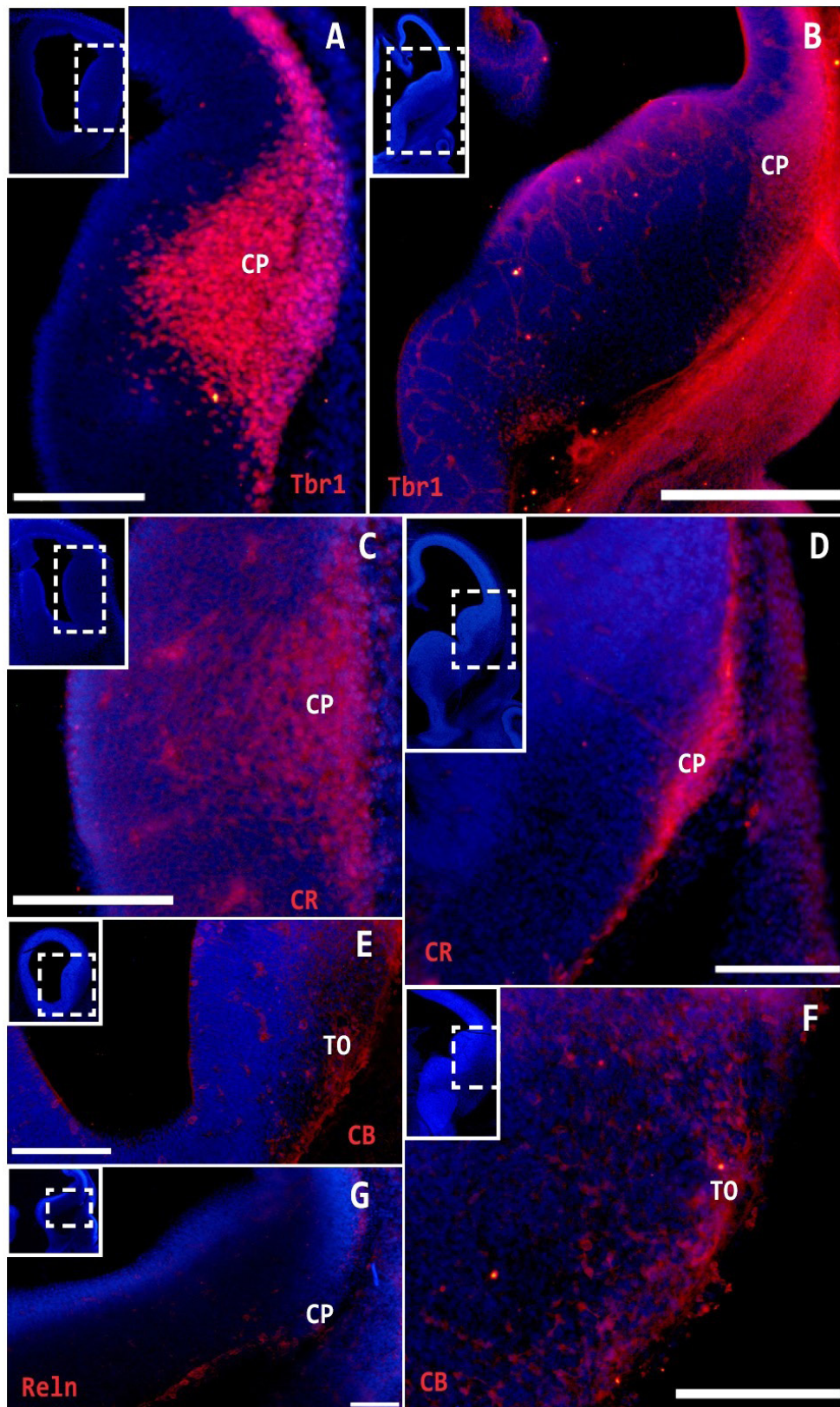
no en el tubérculo olfativo (TO). En E14, la expresión de Tbr1 se detectó claramente en el neuroepitelio cortical y de un modo consistente desde las zonas más rostrales a las más caudales de la CP (Figura 25 A,B). En E18, la expresión de Tbr1 se restringió a la CP y al núcleo endopiriforme (End; Figura 26 A,B), y finalmente, a las capas II y III de la CP madura (Figura 27 A,B).

### **B. EXPRESIÓN DE CALRETININA DURANTE EL DESARROLLO DE LA CORTEZA OLFATIVA**

El patrón de expresión de calretinina (CR) observado en E12 fue similar al observado de Tbr1, aunque algo más restringido a la CP (Figura 24 C,D), de nuevo sin marcaje en el TO. La expresión de CR persistió en la CP en E14 (Figura 25 C,D) pero además, también fue detectada en el tracto olfatorio lateral (tol; Figura 25 D), que se mantuvo en E18 (Figura 26 C,D) y en el ratón adulto (Figura 27 C), junto con la capa II de CP (Figura 27 C,D).

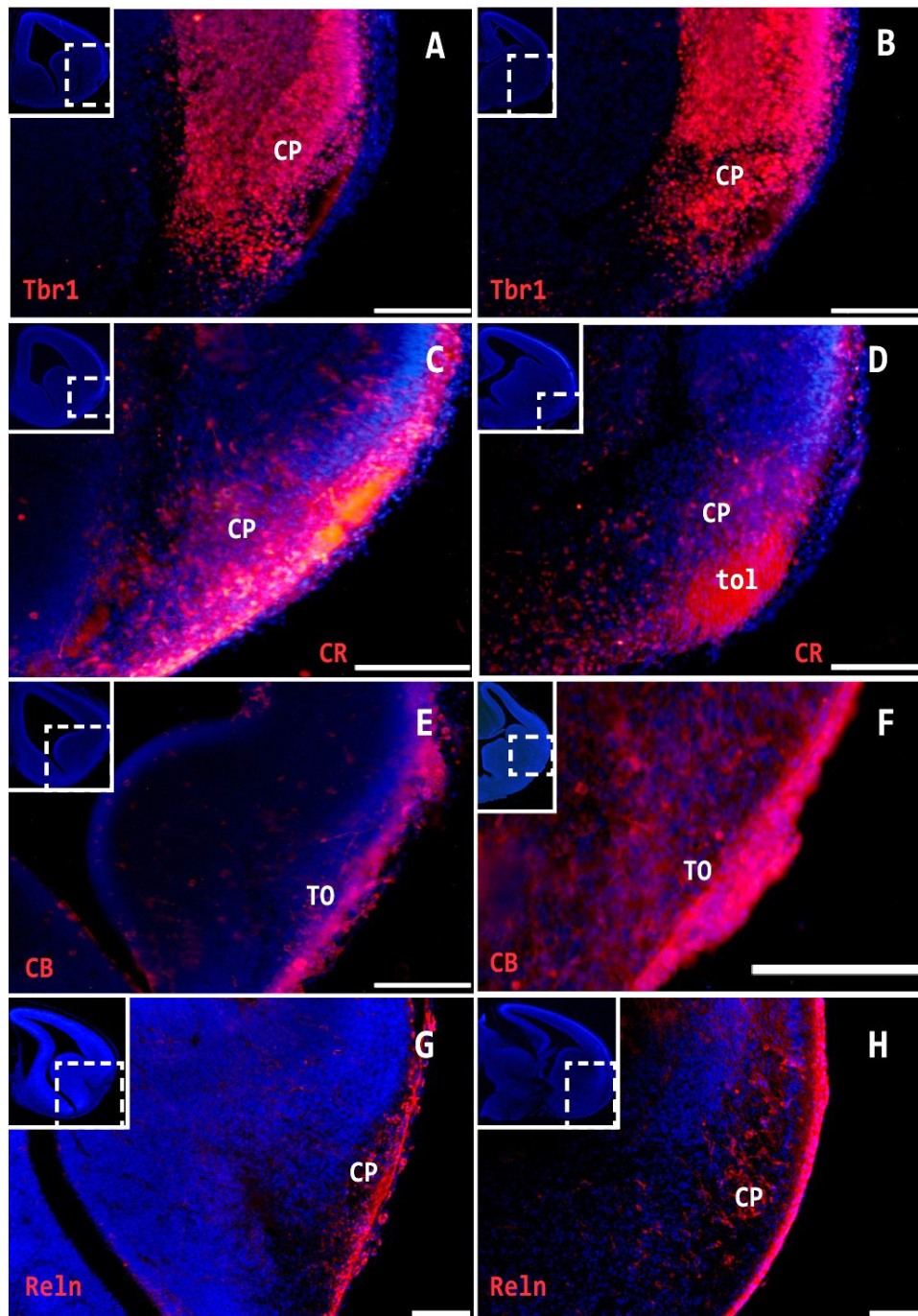
### **C. EXPRESIÓN DE CALBINDINA DURANTE EL DESARROLLO DE LA CORTEZA OLFATIVA**

En contraste con el Tbr1 y la CR, en E12 (Figura 24 E,F) y E14 (Figura 25 E,F) la expresión de calbindina (CB) se restringió al TO, sin detectar marcaje en la CP. En E18 la expresión de CB se limitó únicamente al End (Figura 26 E) y en el adulto, a la capa III de la CP (Figura 27 E,F).



**Figura 24. Expresión de Tbr1, CR, CB y Reln (rojo) en corteza olfativa de E12.** (A-D) El Tbr1 y la CR están presentes en áreas rostral y caudal de la corteza piriforme (CP). (E,F) La CB aparece expresada en el tubérculo olfativo (TO) pero no en la CP. (G) La expresión de Reln está restringida a la parte más externa de la CP. Secciones coronales; la línea media está a la izquierda y la zona dorsal está arriba. Las células azules están marcadas con bisbencimida. Escalas: A-F: 500 μm; G: 100 μm.





**Figura 25. Expresión de Tbr1, CR, CB y Reln (rojo) en corteza olfativa de E14.** (A-D) El Tbr1 y la CR están presentes en las regiones rostral y caudal de la corteza piriforme (CP). La CR también se expresa en el tracto olfatorio lateral (tol, D). (E,F) La CB se expresa en el tubérculo olfativo (TO) pero no en la CP. (G,H) La expresión de Reln se restringe a la zona más externa de la CP. Secciones coronales; la línea media está a la izquierda y la zona dorsal está arriba. Las células azules están marcadas con bisbenzimida. Escalas: A-F: 500  $\mu\text{m}$ ; G,H: 100  $\mu\text{m}$ .

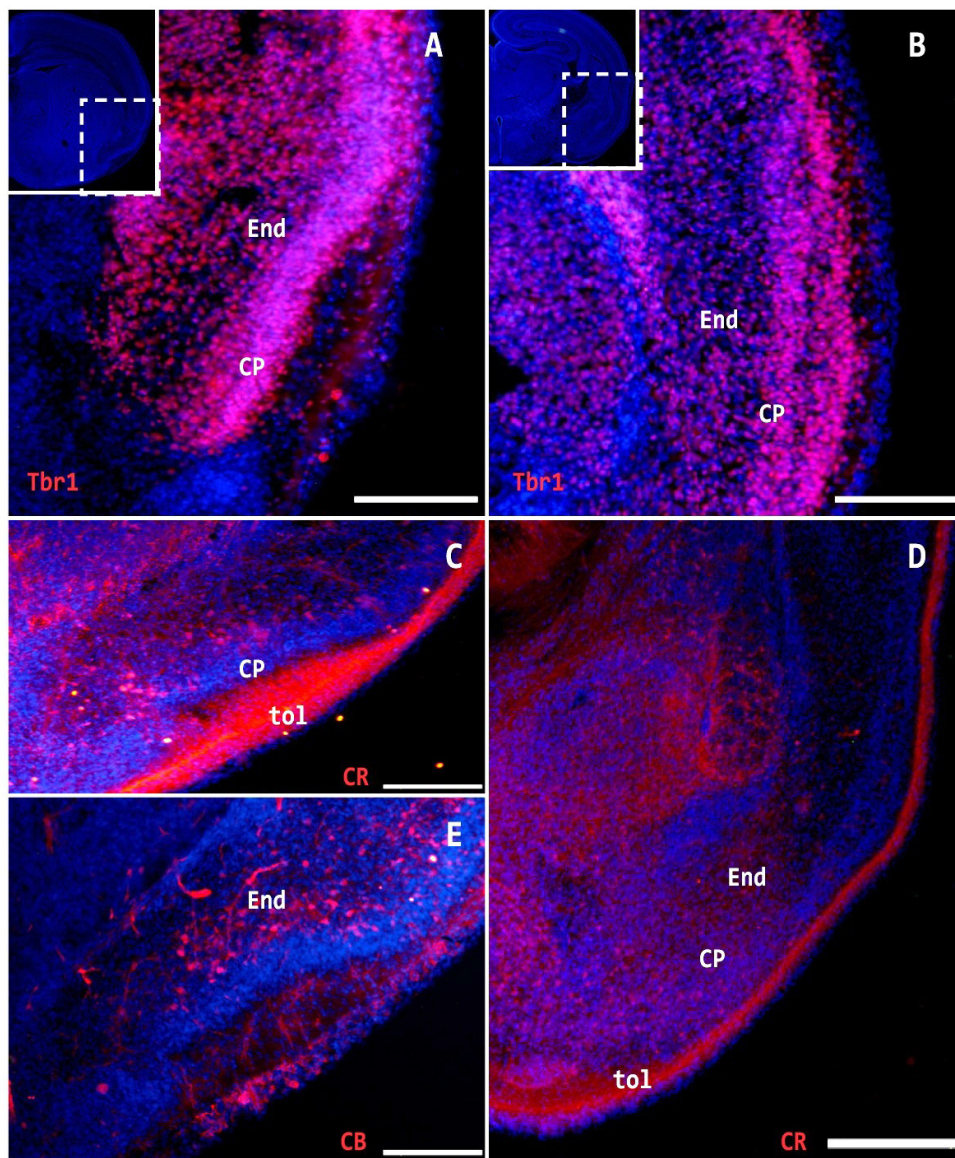
### D. EXPRESIÓN DE RELINA DURANTE EL DESARROLLO DE LA CORTEZA OLFATIVA

La presencia de relina (Reln) en E12 se limitó a la porción más superficial de la CP (Figura 24 G). En E14, este patrón se vio modificado y la Reln pasó a ocupar la parte más interna de la CP (Figura 25 G,H). Un incremento difuso global telencefálico en la expresión de Reln

se observó en estadios más tardíos.

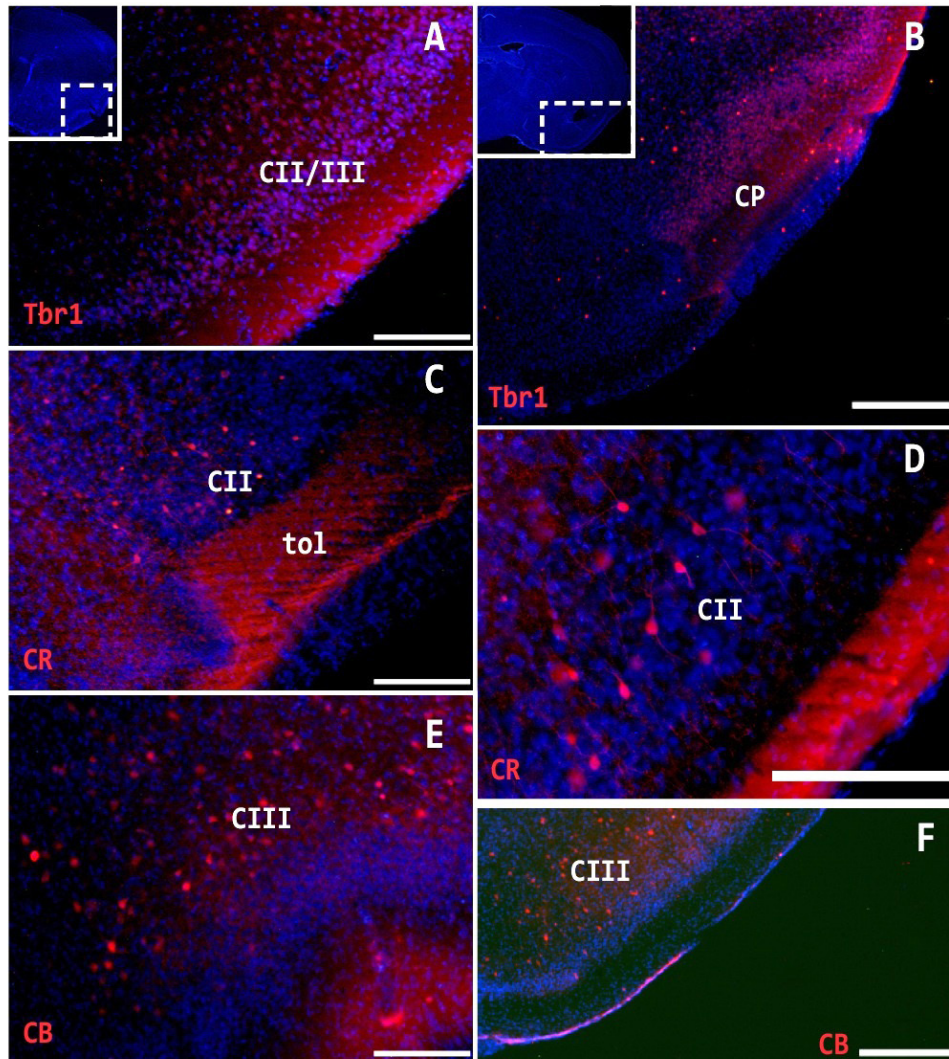
### E. MARCADORES ASOCIADOS CON EL LUGAR DE GENERACIÓN DE LAS CÉLULAS DE LA CORTEZA OLFATIVA

Ya que la utilización de marcadores no permitió identificar si las distintas poblaciones celulares poseían un origen palial o subpalial, se decidió trazar a las células generadas en



**Figura 26. Expresión de Tbr1, CR y CB (rojo) en corteza olfativa de E18.** (A-D) El Tbr1 y la CR están presentes en las regiones rostral y caudal de la corteza piriforme (CP), así como en el núcleo endopiriforme (End; A,B,D). Además, la CR muestra expresión en el tracto olfatorio lateral (tol, C). (E) La CB se expresa únicamente en el End. Secciones coronales; la línea media está a la izquierda y la zona dorsal está arriba. Las células azules están marcadas con bisbencimida. Escalas: A-E: 500 μm.





**Figura 27. Expresión de Tbr1, CR y CB (rojo) en corteza olfativa de ratones adultos.** (A,B) El Tbr1 está presente en las capas II y III de la corteza piriforme (CP). (C,D) La CR se expresa en la capa II de la CP y también en el tracto olfatorio lateral (tol). (E,F) La CB está restringida a la capa III de la CP. Secciones coronales; la línea media está a la izquierda y la zona dorsal está arriba. Las células azules están marcadas con bisbencimida. Escalas: A-F: 500  $\mu$ m.

cada una de estas dos áreas y caracterizarlas a nivel molecular una vez alcanzado su destino.

Con la finalidad de marcar la zona de inyección (lugar de origen celular) se transfectó intraútero, mediante inyección intraventricular y electroporación, de un plásmido de expresión de GFP que se

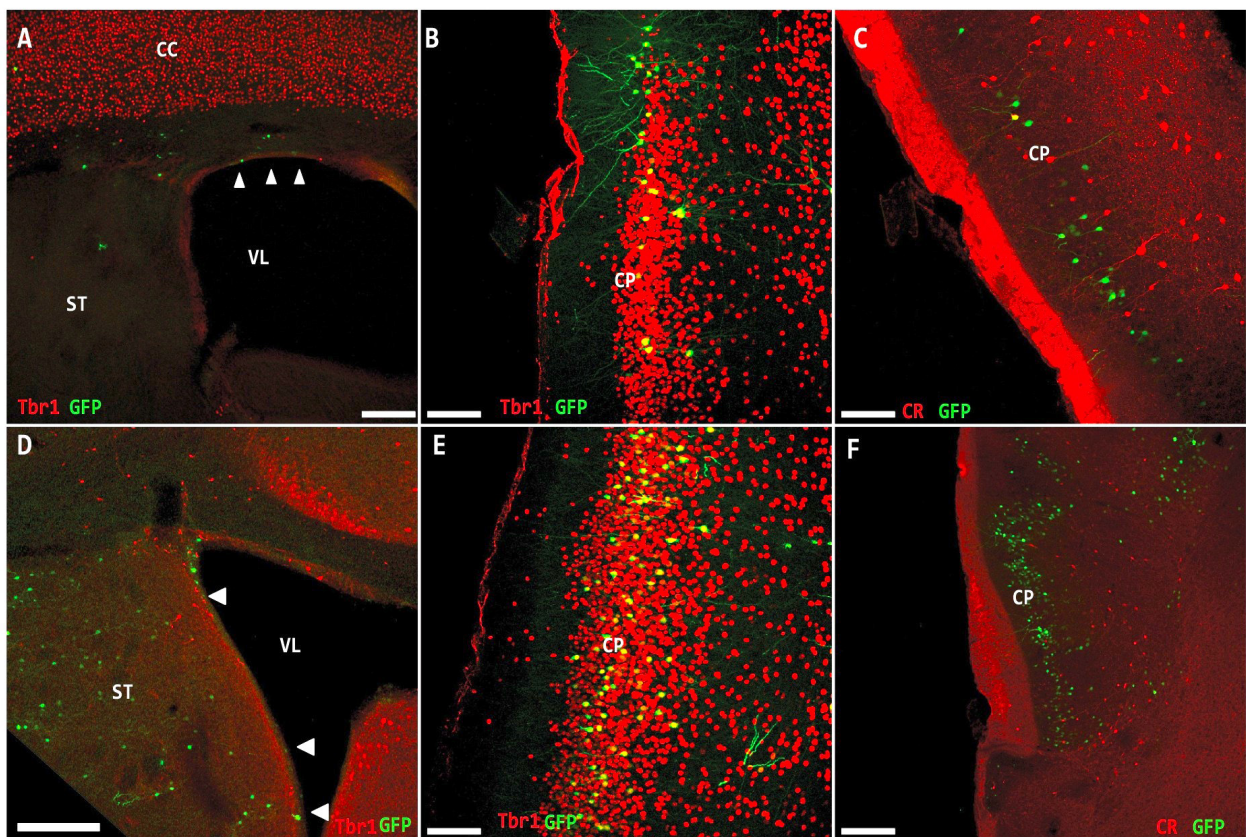
integra en el genoma de las células. Si no se utilizase una construcción que permaneciera en el genoma, el plásmido en cuestión se diluiría en las sucesivas divisiones celulares y en última instancia desaparecería. Así, la finalidad de la utilización de un plásmido que se integra en el genoma nos proporciona un medio de identificación del área en la cual se ha realizado la electroporación (y por tanto,

lugar de origen de las células marcadas). Asimismo, las poblaciones celulares con un número elevado de divisiones no se pierden, al integrarse el plásmido y no diluirse.

En P15, las células transfectadas en E11 en el palio, que presentan expresión de GFP, se detectaron en la corteza piriforme (CP), área de la corteza olfativa (CO; Figura 28 A-C). A pesar de haber sido generadas en un área palial (sin contaminación desde áreas subpaliales; Figura 28 A), se observaron muy pocas células GFP con coexpresión de Tbr1 (propuesto como un marcador de

células originadas en palio; Figura 28 A,B); en cambio no se observaron células derivadas paliales CR positivas (Figura 28 C). Tras la electroporación de células generadas en subpalio (Figura 28 D), se dio la presencia de células GFP que expresaron también Tbr1 (Figura 28 E), pero no CR (Figura 28 F), en la CO.

## II. NUEVAS ÁREAS DE GENERACIÓN DE LAS CÉLULAS DE LA CORTEZA OLFATIVA



**Figura 28. Electroporación de un plásmido GFP en áreas paliales (A-C) y subpaliales (D-F) en E11 y sacrificado en P5.** (A-C) Muchas de las células originadas en la zona ventricular del palio (verde) no colocan con Tbr1 (rojo; A,B). (C) Las células derivadas de palio no expresan CR (rojo). (D-F) Muchas de las células originadas en la zona ventricular de subpalio (verde) colocan con Tbr1 (rojo; D,E). (F) Las células derivadas de subpalio no expresan CR (rojo). Secciones coronales; la línea media está a la derecha y la zona dorsal está arriba. Escalas: A,D: 200  $\mu$ m; B,C,E,F: 100  $\mu$ m.



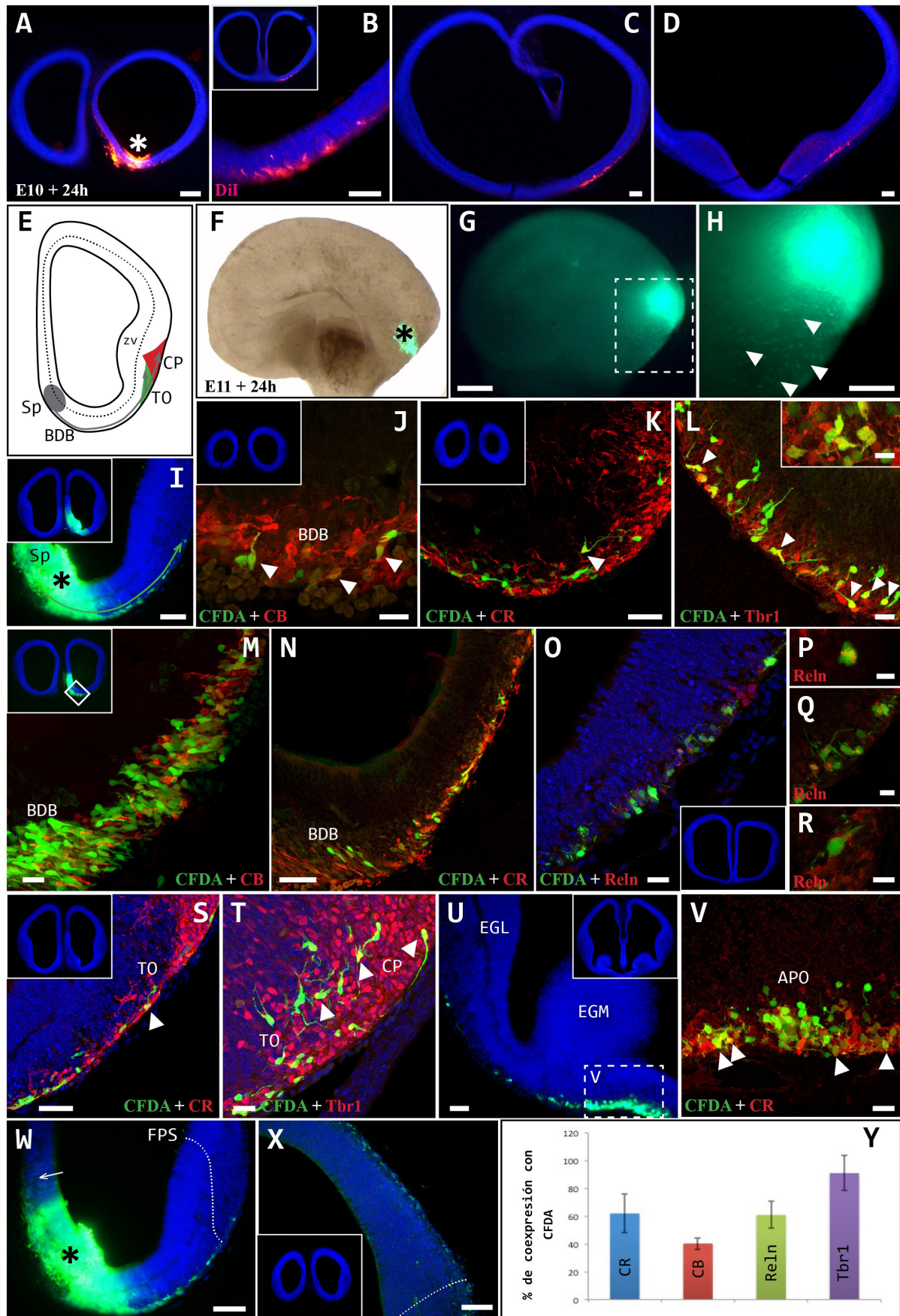
Las células de la corteza olfativa son generadas en varias áreas proliferativas telencefálicas justo antes de la apertura de la preplaca cortical, debida a la acumulación de nuevas células generadas de la placa cortical. Hasta la fecha, el laboratorio del Dr. De Carlos ha estudiado las siguientes áreas de generación que dan lugar en cada uno de los casos a células de la corteza piriforme o a tubérculo olfativo: telencéfalo dorsal, eminencias ganglionares, surco septo-eminencial y muro medial rostral telencefálico. Este apartado se centra en dos áreas proliferativas no reportadas en los estudios previos, el área septal y el palio ventral (la región palial contigua al borde palio-subpalio). Está descrito, además, que estas áreas dan lugar a células de Cajal-Retzius, pero hasta la fecha tampoco habían sido utilizadas técnicas de trazado *in vivo*, sino sólo expresión de marcadores, para determinar la veracidad de este hecho.

Utilizando inyecciones de trazadores, a continuación se describen las rutas migratorias de las células con origen septal y ventropalial, en distintos estadios embrionarios (E10-E12), para determinar las contribuciones individuales de estas regiones proliferativas en el cerebro en desarrollo.

### A. MIGRACIÓN DESDE EL SEPTUM

Para determinar el destino de las células generadas en el área septal en E10 y E11, fueron inyectados trazadores fluorescentes (CFDA o Dil) *ex utero* en embriones que

luego fueron cultivados completos (*in toto*) durante 24 horas. Los embriones inyectados en E10 presentaban marcadas unas pocas células con origen septal (Figura 29 A), las cuales siguieron inicialmente una ruta migratoria ventral y a continuación lateral para alejarse de la línea media hacia la zona palial más externa. Las células posteriormente tomaron un camino caudal para finalmente alcanzar la región media del eje rostro-caudal telencefálico (Figura 29 A-D). Las inyecciones en embriones en E11 mostraron una migración a gran escala a lo largo de las rutas ventral y lateral en dirección a la corteza olfativa (Figura 29 E-H). Las células inicialmente migraron radialmente desde la zona ventricular septal a la capa más externa, migrando a continuación de un modo tangencial hacia la banda diagonal de Broca (BDB) para acabar colonizando el tubérculo olfativo y la corteza piriforme (Figura 29 I-T). Ya en corteza olfativa se observó una variedad de morfologías celulares, incluyendo células fusiformes con procesos sencillos y células bipolares (Figura 29 T), indicando que la diferenciación celular empieza muy temprano en el área olfativa. Además de invadir la corteza olfativa, las células migratorias también colonizaron el área preóptica (Figura 29 U,V), aunque no invadieron la neocorteza ni cruzaron el límite dorsal de la corteza piriforme. Además, no siguieron una ruta migratoria dorsal (circulando a través del muro medial; Figura 29 W,X).



**Figura 29. Migración neuronal desde el septum.** (A-D) Un cristal de Dil fue insertado *ex utero* en el septum (asterisco en A) de un E10 que fue cultivado *in toto* en un frasco giratorio

durante 24 horas. En este estadio, la migración desde el septum fue pequeña y las células migraron hacia la capa más externa de subpalio en dirección caudal para colonizar regiones mediales en el eje antero-posterior (B-D). (E-Y) El trazador CFDA fue inyectado *exo utero* en el septum (asteriscos en F,I; G,H) de un embrión E11, el cual fue cultivado durante 24 horas. (E) Dibujo representando bidimensionalmente la migración celular desde el septum (Sp) hacia las regiones olfativas en desarrollo, el tubérculo olfativo (TO) y la corteza piriforme (CP). (F,G) Visión lateral del cerebro entero tras una inyección de CFDA en el Sp (asterisco) en visiones de campo claro (F) y oscuro (G). (H) Imágenes aumentadas del recuadro en G, mostrando la migración de las células marcadas a través del telencéfalo en tres dimensiones (flechas). (I-T) Desde la zona de inyección (I, asterisco), las células migraron radialmente hacia la capa más externa y desde ahí, migraron ventral y caudalmente hasta alcanzar la banda diagonal de Broca (BDB) en su camino hacia la corteza olfativa. En la colonización de esta estructura, las células ocuparon la parte interior del TO y la región superficial de la CP. (U,V) Algunas células migratorias invadieron la región correspondiente del área preóptica (APO). (W-X) Las células generadas en el Sp (asterisco) no ascendieron a través del muro medial (flecha) ni cruzaron la frontera palio-subpalio (FPS) para entrar en el neuroepitelio cortical. (Y) Porcentaje de células expresando cada marcador: CR (62%), Tbr1 (91%), CB (40%) and Reln (61%). Las flechas indican las células marcadas de CFDA coexpresando los diferentes marcadores. Secciones coronales; la línea media está a la izquierda y la zona dorsal está arriba. Las células azules están marcadas con bisbencimida. Escalas: A, F, G: 200  $\mu$ m; B-D, H, I, W, X: 100  $\mu$ m; K, N, S, U: 50  $\mu$ m; J, L, M, O, T, V: 20  $\mu$ m. Recuadros en L, Q, R: 10  $\mu$ m; P: 5  $\mu$ m.

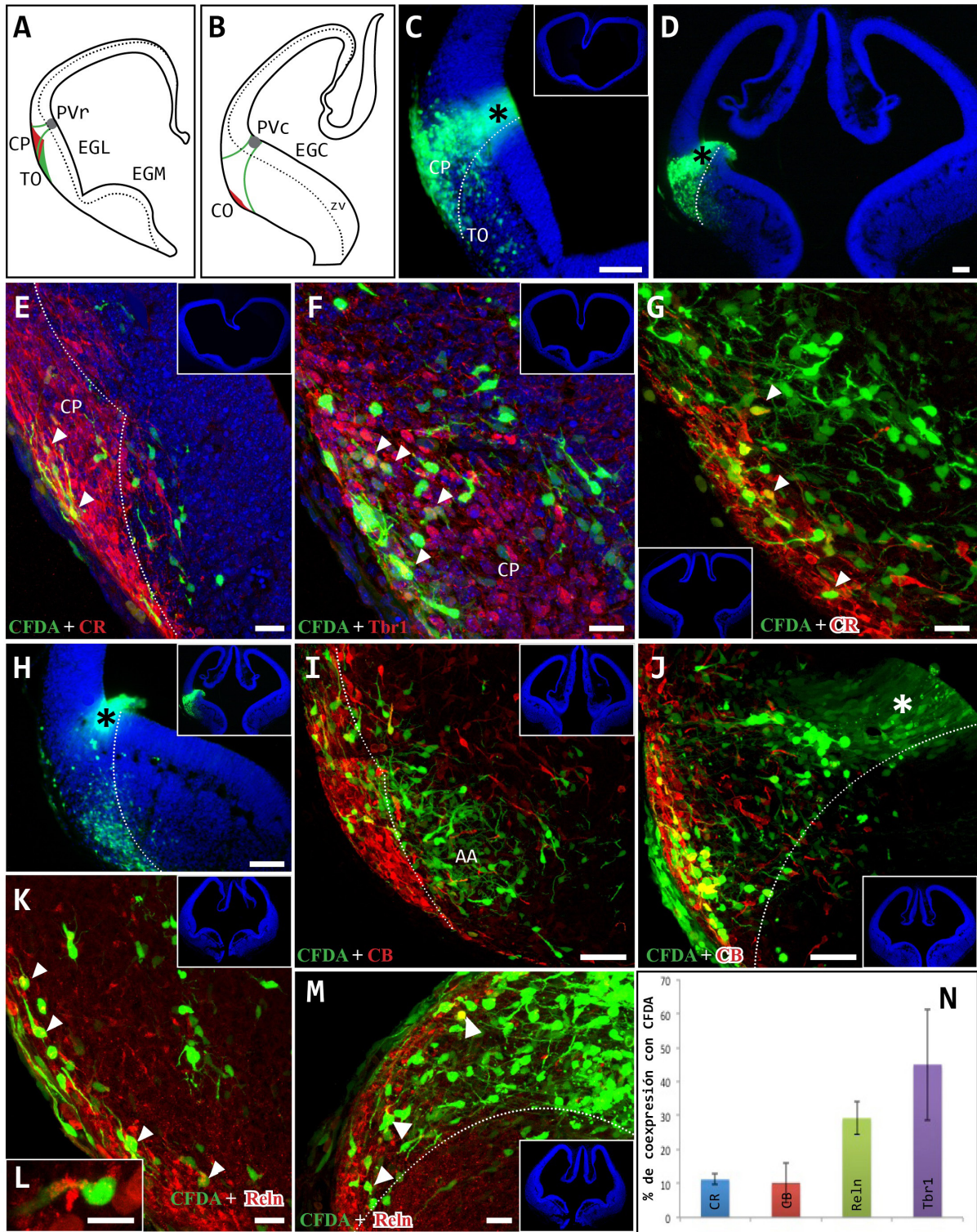
Combinando inmunohistoquímica con trazado de linaje en los embriones enteros, se caracterizaron las distintas poblaciones celulares originadas en el septum. En general, estas poblaciones fueron fuertemente inmunorreactivas para CR, Tbr1, CB y Reln (Figura 29 Y; Prácticamente la totalidad de las células expresaron el marcador palial Tbr1 (91%), muchas expresaron CR (62%) y Reln (61%). Además, el 40% expresó CB, un marcador típico de la población subpalial.

### B. MIGRACIÓN DESDE EL PALIO VENTRAL

El comportamiento migratorio de las poblaciones celulares que provienen del palio ventral fue analizado inyectando el trazador celular fluorescente CFDA en embriones enteros E10-E11, que posteriormente fueron cultivados *in toto*, en frascos rotatorios. El

palio ventral ocupa la parte más dorsal y lateral de la eminencia ganglionar lateral (EGL) y está delimitado ventralmente por el borde palio-subpalio. Como se observó en el septum, la contribución celular por parte del palio ventral a otras áreas en E10 fue limitada. De todos modos, en E11 se observó una migración significativa desde esta región, siguiendo inicialmente una ruta de migración radial desde su lugar de origen en la zona más rostral (PVR) y más caudal (PVC) del palio ventral, para alcanzar la capa marginal de esta estructura (Figura 30 A-D). Desde allí, estas células adoptaron una migración tangencial con una dirección rostro-caudal hacia la corteza piriforme. Así, las células generadas en el palio ventral de embriones E11 migraron tangencialmente para ocupar áreas olfativas, llegando hasta la porción





**Figura 30. Migración neuronal desde el palio ventral.** El trazador CFDA fue inyectado *ex utero* en E11 que posteriormente fueron cultivados *in toto*, en frascos giratorios, durante 24 horas. (A,B) Dibujos esquemáticos mostrando la localización del sitio de inyección (círculo gris) en el palio ventral rostral (PVR) y en el caudal (PVC). (C,D) Las células marcadas migraron desde su origen (asterisco negro) hacia la superficie pial a través del manto de la eminencia ganglionar lateral (EGL) para llegar a corteza piriforme (CP). Pocas células invadieron el área correspondiente al tubérculo olfativo (TO). Las líneas discontinuas definen la frontera entre CP y TO. (E-G) Embrión inyectado en el PVR. Las células marcadas de CFDA (verde) ocuparon la

extensión rostro-caudal de la CP. Las imágenes muestran reacciones inmunohistoquímicas (células rojas) contra calretinina (CR; E,G) y Tbr1 (F); las flechas indican las células doblemente marcadas. (H-M) Embriones inyectados en el PVr (asterisco). Las células marcadas con CFDA (verde) migraron a través del eje rostro-caudal del cerebro para ocupar prácticamente toda la extensión de corteza olfativa (CO), invadiendo incluso las áreas amigdalinas (AA; I). Estas células no se restringieron a la porción más superficial sino que también poblaron la zona profunda de la CP (J-M). Las imágenes muestran la reacción inmunohistoquímica (células rojas) contra calbindina (CB; I, J) y relina (Reln; K-M). (N) Porcentaje de células expresando cada marcador: CR (11.2%), Tbr1 (45%), CB (10.2%) y Reln (29.3%). Secciones coronales; la línea media está a la derecha y la parte dorsal está arriba. Las células azules están marcadas con bisbencimida. Escalas: C-E, H: 100  $\mu$ m; I, J: 50  $\mu$ m; E-G, K-M: 20  $\mu$ m.

caudal de la corteza piriforme (Figura 30 E-M) y los núcleos amigdalinos mediales (Figura 30 I). Finalmente, estas poblaciones celulares ocuparon la completa extensión de la corteza piriforme, rostral y caudalmente en la zona de manto más profunda. Estas rutas migratorias resultaron ser muy específicas, encontrando muy pocas células que cruzan el borde entre la corteza piriforme y el tubérculo olfativo (Figura 30 C,D,H,J,M).

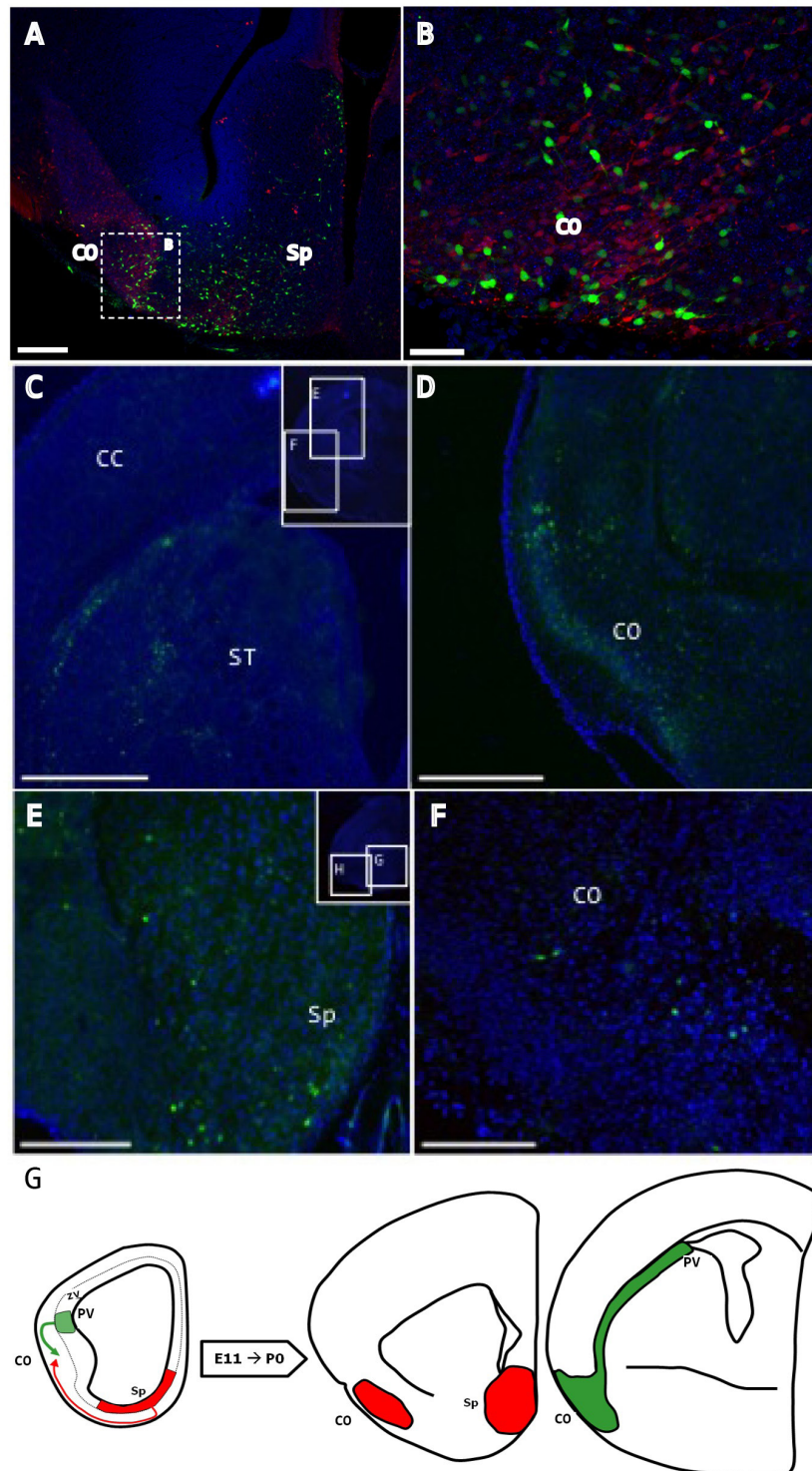
Las poblaciones celulares que migran desde el palio ventral fueron caracterizadas por su heterogeneidad morfológica, presentando preferentemente morfologías fusiforme y bipolar, orientadas en diferentes planos. Los marcadores individuales fueron expresados por las células migratorias como sigue: CR, 11%; Tbr1, 45%; CB, 10%; y Reln, 29%. No fue encontrado ningún marcador que presentara un alto porcentaje de coexpresión con la población CFDA positiva (Figura 30 N).

### C. ANÁLISIS POSTNATAL DE LA MIGRACIÓN CELULAR DESDE EL SEPTUM Y EL PALIO VENTRAL

Se inyectó el marcador CFDA *in utero* en embriones E10-E11 utilizando un sistema de

guiado por ultrasonidos (VeVo 770), lo que nos valió para confirmar que, con el diseño experimental previo, se había permitido el tiempo suficiente para que las poblaciones celulares generadas en septum y palio ventral alcanzasen sus respectivos destinos adultos y definitivos, y así poder descartar la posibilidad de que estas células migren a otras áreas, tales como la corteza cerebral, según había sido propuesto con anterioridad (Bielle y col., 2005; Gelman y col., 2009; Gelman y col., 2011). Los análisis del marcaje resultante en ratones embrionarios (E15; Figura 31 A,B) y neonatales (P0; Figura 31 C-F) revelaron patrones migratorios equiparables, donde las células generadas en el septum se establecieron en la corteza olfativa (corteza piriforme y tubérculo olfativo) y no alcanzaron el manto cortical. El marcador CB (Figura 31 A-C) se utilizó para identificar la población olfativa. De un modo similar, las inyecciones *in utero* en el palio ventral revelaron patrones similares en embriones E11 y E15, con células invadiendo la corteza olfativa, indicando que las neuronas CFDA positivas, marcadas desde el palio ventral, no colonizan la neocorteza (Figura 31 C,D,G).





**Figura 31. Migración neuronal desde el palio ventral y el septum desde E11-E15 (A-D) y E11-P0 (E-H).** El trazador fluorescente CFDA fue inyectado *in utero* de E11 utilizando un sistema guiado por ultrasonidos. (A-D) Células marcadas con CFDA (en verde) generadas en E11 en el septum (Sp) y analizadas 4 días después. (A-C) La expresión de CR se muestra en rojo. En E15, las células generadas en el área septal no colonizan la corteza cerebral (CC). (E-F) Células marcadas de CFDA (verde) generadas en E11 en el palio ventral (PV) y analizadas en P0. En ratones neonatales, las células derivadas de PV migraron hacia corteza olfativa (CO) pero no invadieron la corteza cerebral (CC). (G,H) Las células marcadas (verdes) generadas en el septum (Sp) en E11, sólo colonizaron la CO durante el desarrollo embrionario y no ocuparon la CC. I: Dibujos esquemáticos mostrando las rutas migratorias de las poblaciones celulares generadas

en el PV y el Sp desde E11 hasta P0, y la localización de estas células al alcanzar sus destinos. Secciones coronales; la línea media está a la derecha y la parte dorsal está arriba. El tejido fue contrateñido con bisbencimida (azul). Escalas: A, G, H: 100  $\mu$ m; E, F: 500  $\mu$ m; B-D: 200  $\mu$ m.

### III. ONTOGENIA DE LAS CÉLULAS DE LA SUBPLACA

La subplaca, como su propio nombre indica, es la capa celular situada justo por debajo de la placa cortical y suprayacente a la sustancia blanca. Se trata de una capa cortical temprana de poblaciones celulares muy heterogénea. Junto con la zona marginal, la subplaca es el resultado de la apertura de la preplaca por la intercalación de las células de la placa cortical entre ambas.

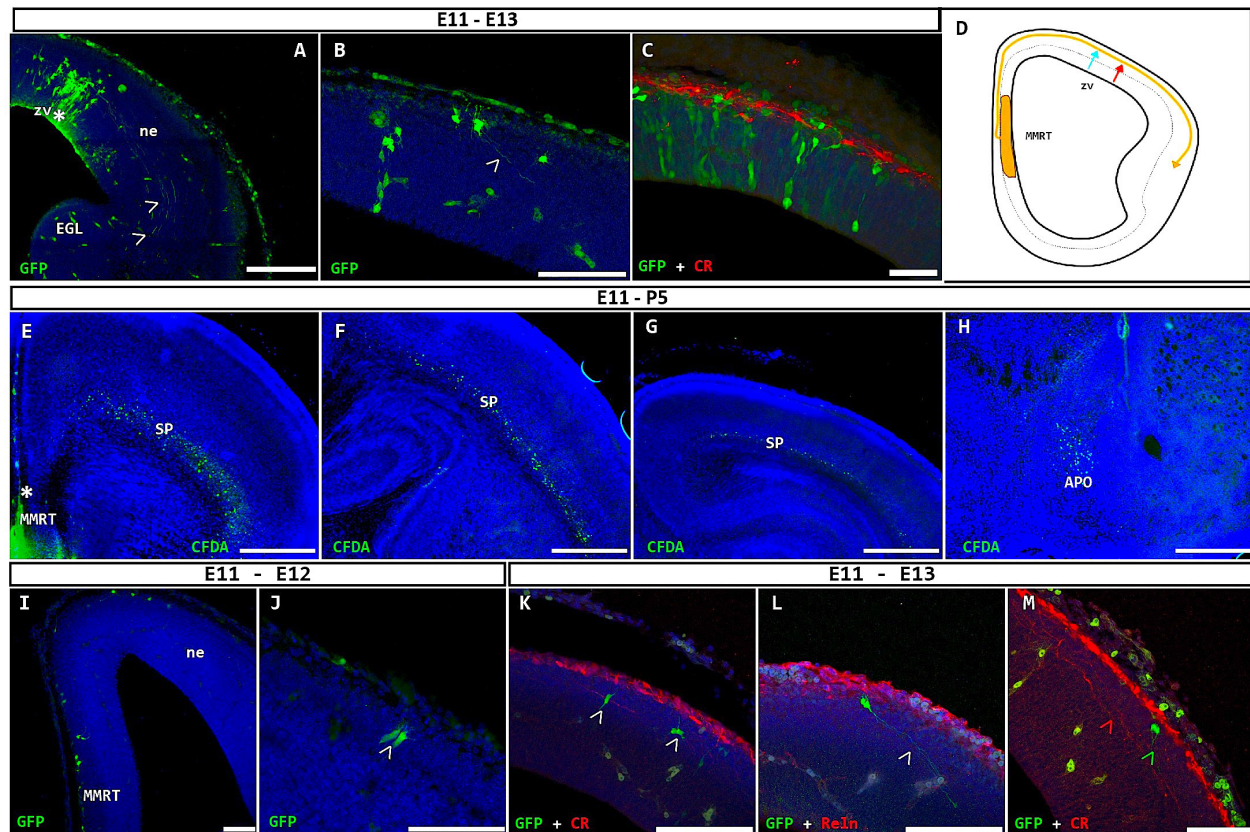
A día de hoy, se piensa que las células de la subplaca se originan en la zona ventricular del neuroepitelio cortical. Sin embargo, existen algunos estudios que apuntan a un origen dual de la subplaca; no sólo neocortical, sino también externo al neuroepitelio cortical. Pero, si realmente existe un origen externo de estas células es algo desconocido en la actualidad.

Los apartados que se describen a continuación se plantearon como un estudio sobre el posible origen extra-cortical de estas células y, por lo tanto, verificar si existe un vínculo entre la heterogeneidad fenotípica de esta estructura y una posible heterogeneidad ontogénica.

#### A. LUGARES DE ORIGEN DE LAS CÉLULAS DE LA SUBPLACA

Con la finalidad de discernir el origen/ orígenes de las células de la subplaca y poder realizar una descripción posterior, se procedió al trazado de poblaciones ontogénicamente heterogéneas. Para ello, se realizaron inyecciones *in utero* de distintos tipos de trazadores celulares (CFDA, Dil, retrovirus que expresan GFP o electroporación de plásmidos que expresan GFP) en distintas áreas proliferativas del telencéfalo de embriones en estadio de preplaca. Estas inyecciones fueron facilitadas por un sistema de ultrasonidos. Se permitió a posteriori la supervivencia hasta estadios embrionarios más tardíos o incluso hasta el nacimiento y desarrollo postnatal temprano.

El patrón de expresión de calretinina (CR) en el día embrionario 10 (E10), descrito en estudios previos en el laboratorio (García-Moreno y col. 2007), sugiere que las células CR positivas generadas en la zona ventricular del neuroepitelio cortical migran radialmente hasta alcanzar la preplaca. Para confirmar este dato, sugerido por expresión de marcadores, se realizaron inyecciones de retrovirus-GFP en estadio de preplaca E11 (Figura 32 A-C; debido a la dificultad de un abordaje experimental preciso en estadios por debajo de E11). Más tarde, en E13, se encontraron células marcadas en el neuroepitelio cortical, en la zona adyacente a la inyección, siguiendo el eje de la glía



**Figura 32. Colonización de subplaca desde la zona ventricular (zv) del neuroepitelio cortical (A-C) y desde el muro medial rostral telencefálico (MMRT; E-M).** (A-C) Retrovirus que expresan GFP fueron inyectados *in utero* utilizando un sistema guiado por ultrasonidos. Células marcadas (verde) generadas en E11 y analizadas 2 días más tarde. Las células generadas en la zv (asterisco) migran radialmente hacia el área más externa del neuroepitelio (ne; A-C), y se observan axones emitidos por éstas (A-B; flechas) que alcanzan el área a ocupar por la cápsula interna (A; flechas). Esta población es distinta de las células que expresan CR (rojo; C). (E-H) El trazador fluorescente CFDA fue inyectado *in utero* en E11 en el MMRT y las células marcadas fueron analizadas 5 días después del nacimiento (E-H). Las generadas en MMRT colonizaron la subplaca a lo largo de su eje rostrocaudal y lateromedial (E-G) y el área preóptica (APO, H). (I-M) Inyecciones de retrovirus que expresan GFP fueron realizadas en E11 y estudiadas en E12 (I,J) y en E13 (K-M). Las células marcadas (verde) toman un camino dorsal colonizando el neuroepitelio cortical a lo largo de toda su extensión (I). Se observan morfologías piriformes (J, flecha), bipolares y fusiformes (K, flechas) y células de proyección (L, flecha; M, flecha verde) que no expresan relina (rojo). En E13 las células marcadas no colocalizan con CR (rojo, K, M), y algunas de las células no-GFP que expresan este marcador también proyectan (flecha roja, M). (D) Dibujo representando los tres tipos de migración a subplaca: línea amarilla: células provenientes de MMRT; línea azul: células generadas en el neuroepitelio cortical CR-; línea roja: células generadas en el neuroepitelio cortical CR+. Secciones coronales; la línea media está a la izquierda y la parte dorsal está arriba. El tejido fue contrateñido con bisbencimida (azul). Escalas: A: 50  $\mu$ m; B, C, J-M: 25  $\mu$ m; E- H: 500  $\mu$ m; I: 100  $\mu$ m.

radial (Figura 32 A,B flechas). Estas células son de proyección subcortical, observándose sus axones a nivel de la prospectiva cápsula

interna (Figura 32 A; flechas). En este estadio ha sido descrito que las únicas células que proyectan subcorticalmente son una



subpoblación de las células de la subplaca (De Carlos y O'Leary, 1992). Por lo tanto, podemos asumir, sin la necesidad de realizar ningún marcaje adicional, que se trata de células de la subplaca. Sin embargo, estas células no expresaron CR, sugiriéndose la existencia de, al menos, dos poblaciones celulares distintas, generadas en el neuroepitelio cortical y que presentan, muy probablemente, un patrón de generación temporal distinto (E10 vs. E11).

Por otro lado, se llevaron a cabo inyecciones *in utero* del trazador celular CFDA en E11 (Figura 32 E-H), de nuevo guiadas por ultrasonidos, en el muro medial rostral telencefálico (MMRT, estructura medial extra-cortical y palial, que se sitúa dorsal al septum y rostral al cortical-hem). Tras permitir el posterior desarrollo embrionario (Figura 32 I-M) y dejándose alcanzar hasta el estadio P5 (Figura 32 E-H), el trazado también mostró una colonización de la subplaca, esta vez a lo largo de todo su eje rostro-caudal, junto con otras estructuras, como es el área preóptica (APO; Figura 32 1 H).

### **i. Origen extra-cortical de la subplaca: El Muro Medial Rostral Telencefálico**

Inyecciones de trazadores celulares (CFDA, retrovirus, plásmidos-GFP o Dil) en E11 mostraron 24 horas más tarde, en E12, que las células generadas en MMRT en estadio de preplaca, migran siguiendo un camino dorso-caudal colonizando la preplaca a lo largo de todo el eje medio-lateral y rostro-

caudal (Figura 32 I-J). Después de 48 horas de la inyección, en E13 (se empieza a dar la apertura de preplaca; Figura 32 K-M), ya se pudieron observar las primeras células aisladas proyectando subcorticalmente (Figura 32 L, flecha; Figura 32 M, flecha verde), siendo distintas de aquellas proyecciones de las células CR+ (Figura 32 M, flecha roja). Además, se encontraron otras células que presentaban una morfología fusiforme y bipolar, más típica de interneuronas (Figura 32 K), adquiriendo por lo tanto, ya en este estadio temprano, una cierta diferenciación celular. Pese a no haberse dado la totalidad de la apertura de la preplaca, se observó una tendencia a la separación física entre células que permanecen en la capa más inferior: la subplaca, y otras en la capa más superior: la zona marginal (Figura 34). En E18, cuando la apertura de preplaca ya se había completado, se observó cómo las células trazadas desde el MMRT siguen estando presentes, disponiéndose en una fina hilera, justo debajo de la placa cortical, en la zona de la subplaca (Figura 35). Además, en esta edad se pudieron percibir algunas células marcadas, derivadas de MMRT, en corteza olfativa y en hipocampo, junto con otras que finalmente se asientan en la zona marginal (Figura 35 J-M). Por otro lado, se observó también la presencia de algunas células marcadas en capas infragranulares de corteza, V y VI (Figura 35 F). Estudios en estadios postnatales (P8) mostraron la persistencia de esta población celular en la

subplaca, así como de las células de las dos capas superiores colindantes (Figura 36).

Resumiendo, encontramos al menos tres poblaciones celulares distintas que van a poblar la subplaca (Figura 32 D): las derivadas de MMRT y las dos poblaciones generadas en el neuroepitelio cortical, una población CR+ y otra CR-.

### **a. Tiempo de generación de las células de la subplaca provenientes del MMRT**

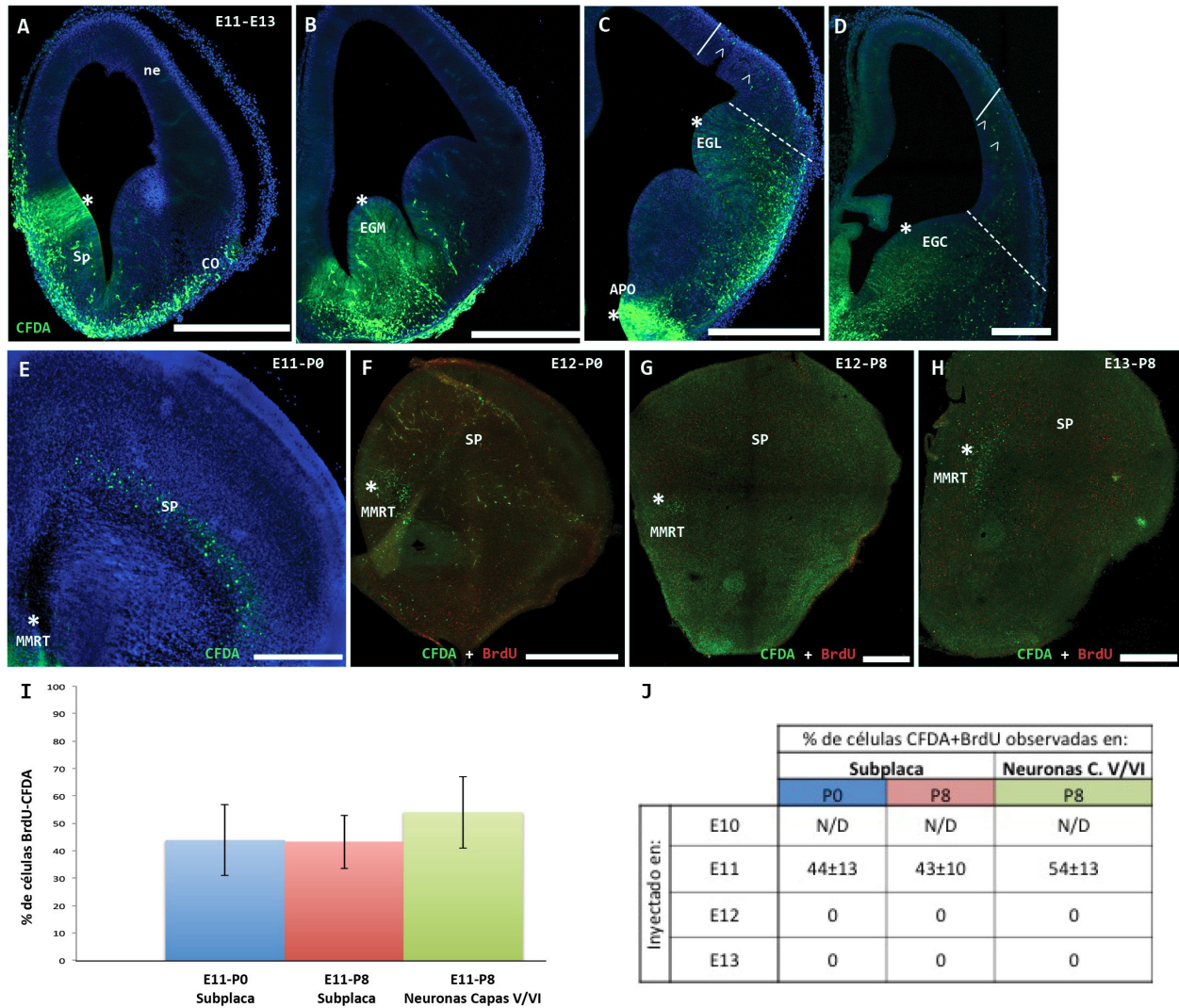
Estudios de proliferación celular, mediante inyección intraperitoneal de bromo-deoxiuridina (BrdU), análogo de la timidina, en el mismo momento de la realización del trazado celular (Figura 33 E-J), revelaron que las células marcadas desde el MMRT y localizadas en subplaca se generan entre E10 y E11 ( $44\pm 13\%$  observado en P0 y  $43\pm 10\%$  observado en P8). Éstos fueron llevados a cabo únicamente en E11, no siendo necesario el estudio de proliferación en E12 puesto que al realizar inyecciones *in utero* de trazadores celulares a partir de E12 en MMRT ninguna célula abandonó esta estructura (Figura 33 F-H). Además, se estudió también la generación de las células provenientes de MMRT en las capas V y VI de corteza (Figura 33 I-J), observándose que éstas se cogenen temporalmente con las células que permanecen en subplaca, entre E10 y E11 ( $54\pm 13\%$ ).

### **b. Migración celular desde las áreas adyacentes al MMRT**

Teniendo en cuenta que los experimentos

previos sólo apuntan a que el origen de esta subpoblación de células de la subplaca se localiza en un área medial del telencéfalo, sin acotar específicamente, se realizaron controles espaciales con la finalidad de concretar la zona exacta de generación dentro del muro medial. Además, con ello se pretendió averiguar si existe otra estructura extra-cortical que aporte células a la subplaca. Para ello, se realizaron inyecciones focales *in utero* con el trazador celular CFDA en distintas estructuras (adyacentes o no al MMRT; Figura 33 A-D): septum, eminencias ganglionares (medial, lateral y caudal) y área preóptica. Las inyecciones se realizaron en E11 y se llevó a cabo el estudio en E13. La elección de E13 como edad de estudio se debe a que existen trabajos previos en los que se demuestra que las células de la subplaca en ratón se generan únicamente en estadio de preplaca y no posteriormente (E13 o superior), encontrándose dispuestas en su lugar ya en esos estadios previos.

Desde el septum (Figura 33 A), tal y como ha sido descrito en un apartado previo, las células generadas migraron inicialmente de un modo radial, pasando posteriormente a una migración tangencial y ventral para colonizar la corteza olfativa. Sin embargo, no hubo un ascenso por parte de ninguna célula tomando una vía dorsal y medial para colonizar el neuroepitelio cortical. De este modo se descarta que las inyecciones en MMRT contengan células con migración ascendente desde septum.



**Figura 33. Comportamiento migratorio de las células provenientes de las áreas adyacentes al muro medial rostral telencefálico (MMRT, A-D) y ensayo de generación celular de las células derivadas de MMRT (E-J).** (A-D) Inyecciones *in utero* guiadas por un sistema de ultrasonidos en E11 y analizadas en E13, del trazador celular CFDA (verde) en las siguientes áreas (asteriscos): septum (Sp, A), eminencia ganglionar medial (EGM, B), eminencia ganglionar lateral (EGL, C), área preóptica (APO, C) y eminencia ganglionar caudal (EGC, D). (A) Las células generadas en septum migran hacia la zona más externa del área, para posteriormente migrar tangencialmente y colonizar la corteza olfativa (CO); estas células no siguen una ruta dorsal para alcanzar el neuroepitelio cortical (ne). (B) Las células generadas en EGM migran hacia su parte externa y no ascienden al ne, al menos en este estadio de estudio. (C) Las células generadas en EGL y en APO sí transgreden la frontera cortico-estriatal (línea discontinua) alcanzando el ne (flechas), pero en E13 no cubren toda su extensión (línea continua). (D) Las células generadas en EGC se comportan igual que en C. (E-H) Inyecciones del marcador celular CFDA en el MMRT a distintos estadios embrionarios y estudiadas tras el nacimiento. (E) Inyecciones en E11 con un posterior análisis en P0 muestran células colonizando la subplaca (SP). (F-H) Inyecciones de CFDA en E12 y estudiadas en P0 y en P8 (F,G) o en E13 y estudiadas en P8 (H), no muestran ascenso por parte de las células marcadas a SP (en rojo BrdU). (I,J) Contaje de las células generadas en MMRT en los distintos estadios embrionarios mediante estudio con BrdU. (I) Las células observadas en SP como las de capas V y VI de corteza, comparten momento de generación. (J) Al menos la mitad de

las células generadas en MMRT se generan en E11 o en estadios anteriores, pero no posteriores. Secciones coronales; la línea media está a la izquierda y la parte dorsal está arriba. El tejido fue contrateñido con bisbencimida (azul). Escalas: A-C, F: 50  $\mu$ m; D, G, H: 100  $\mu$ m; E: 500  $\mu$ m.

El trazado desde la eminencia ganglionar medial (Figura 33 B) mostró una colonización de corteza olfativa desde su zona ventricular, no encontrándose en este estadio colonización del neuroepitelio cortical. No obstante, desde las eminencias ganglionares lateral y caudal y desde el área preóptica (Figura 33 C,D) sí se da una ligera colonización celular hacia el neuroepitelio cortical, aunque próxima al borde palio-subpalio (línea discontinua) no alcanzando toda la extensión de corteza (línea continua).

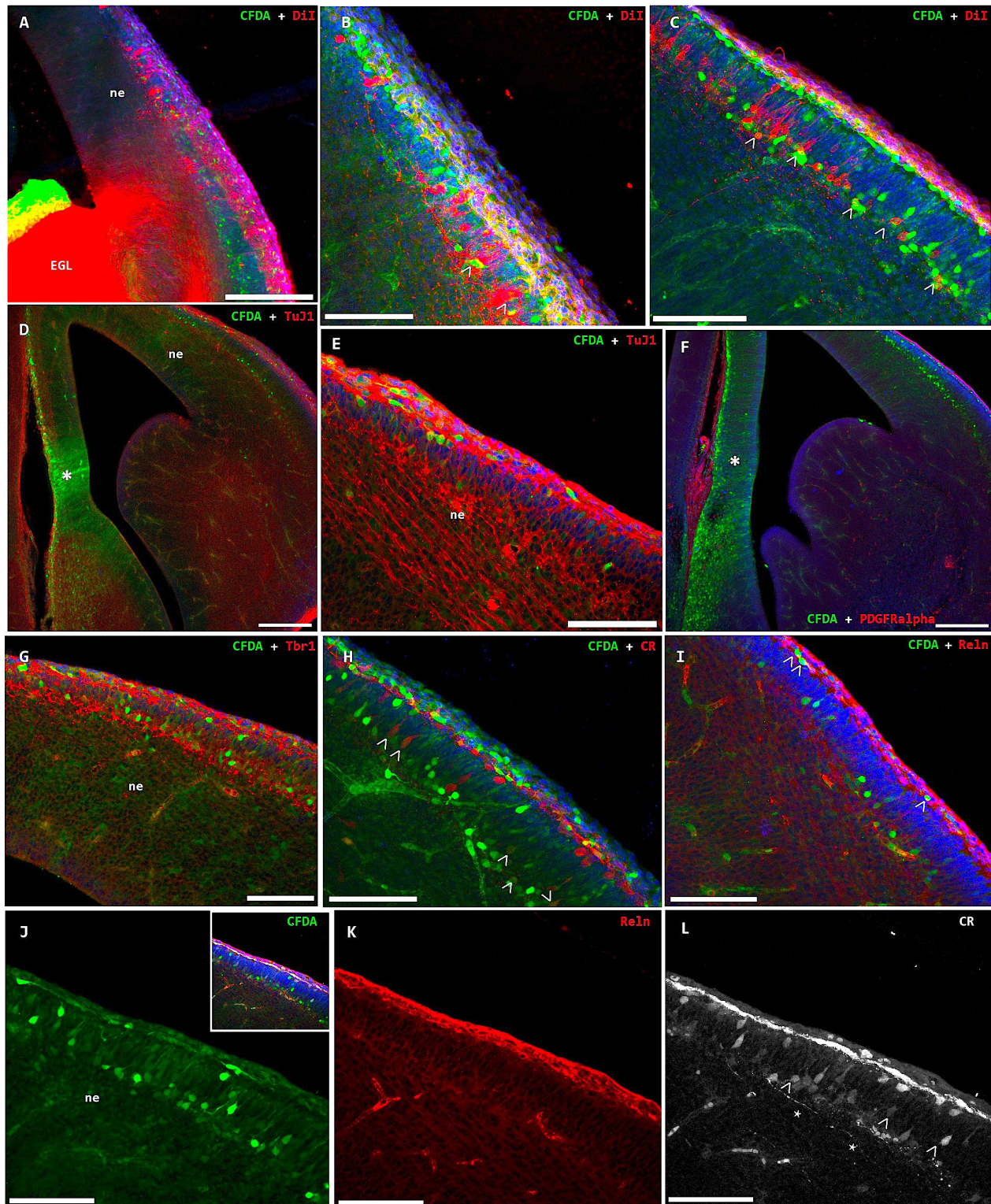
### **c. Caracterización de las células de la subplaca provenientes del MMRT**

Las células de la subplaca presentan una heterogeneidad fenotípica en cuanto a expresión de distintos marcadores. Se puede discernir, incluso, entre células de proyección e interneuronas. Además, esta población está compuesta de subpoblaciones concretas de células que expresan distintos marcadores. Con la finalidad de caracterizar las células de subplaca derivadas del MMRT y comprobar si existe una evolución en el patrón de expresión de marcadores específicos, se realizaron reacciones inmunohistoquímicas contra distintos marcadores, a distintas edades embrionarias y postnatales, siempre en ratones en los que la población de subplaca derivada de MMRT había sido trazada con anterioridad.

### **Caracterización en estadio de E13**

En primer lugar, se pretendió observar si estas células, derivadas de MMRT y establecidas en subplaca, proyectaban fuera de corteza, y de ser así, si utilizaban la cápsula interna. Ya que es conocido que las únicas células que proyectan subcorticalmente en E13 (encontrándose sus axones a nivel de la futura cápsula interna a ese estadio, De Carlos y col., 1992) son las células de la subplaca, se asegura con ello que cualquier célula que proyecte por este camino en E13, pertenece a subplaca y no a otros estratos superiores que van a proyectar en estadios posteriores. Para ello, se insertó un pequeño cristal de Dil, una vez fijado el tejido en E13, en la frontera palio-subpalio (borde corticoestriatal, lugar por donde transcurrirá la cápsula interna) y se permitió su transporte, en la oscuridad, durante una semana (Figura 34 A-C). Los cerebros fijados que utilizamos para insertar el cristal de Dil, habían sido inyectados previamente *in utero* con CFDA en E11 y, por lo tanto, las células provenientes del MMRT y asentadas en subplaca estaban marcadas con este trazador. Con ello, se pudo estudiar la colocación entre el trazador celular (en este caso CFDA) y el Dil (Figura 34 B-C). Se comprueba, de esta manera, que algunas de las células de subplaca provenientes del MMRT mediante migración tangencial,





**Figura 34. Caracterización de las células derivadas de MMRT en E13.** (A-C) Inyección en MMRT de CFDA en E11 y posterior inserción de un cristal de DiI en E13, en la frontera palio-subpalio (prospectiva cápsula interna; A) sobre tejido fijado. Células que coexpresan DiI (rojo) y CFDA (verde) en el neuroepitelio cortical (ne; flechas en B,C). (D-L) Caracterización inmunohistoquímica (rojo o blanco) de las células derivadas de MMRT (verde) en E13. Las células derivadas de MMRT (área de inyección: asterisco en D) expresan TuJ1 en la totalidad del neuroepitelio cortical (ne; D,E). (F) La expresión de PDGFRalpha se restringe a las zonas basales telencefálicas y las células CFDA no expresan este marcador glial en el neuroepitelio cortical. (G) Todas las células derivadas de MMRT expresan en marcador palial Tbr1 en ne. (H) Algunas de las células marcadas con CFDA

en el ne expresan CR, indistintamente en la zona más interna de la placa cortical (PC), en el inicio de su apertura (flechas en H y en L) o en la zona más externa (L); en este caso, colocalizando con la expresión de relina (J-L). (I,K) La expresión de Reln se restringe a la capa más externa de la PC y todas las células que están marcadas de CFDA expresan Reln en esta zona más externa (flechas en I). Secciones coronales; la línea media está a la izquierda y la parte dorsal está arriba. El tejido fue contrateñido con bisbencimida (azul). Escalas: A, D, F: 100  $\mu$ m; B, C, E, H- L: 25  $\mu$ m; G: 50  $\mu$ m.

proyectan subcorticalmente, colaborando a la formación de la cápsula interna.

Por otro lado, tras llevar a cabo técnicas inmunohistoquímicas sobre cortes de cerebros, previamente inyectados *in utero* con CFDA en E11 (Figura 34 D-L), se observó que las células de subplaca generadas en MMRT expresan el marcador neuronal TuJ1 (beta-tubulina de tipo III; Figura 34 D-E). Además, ya que hay evidencias de que existe presencia de glía inmunorreactiva para PDGFRalpha proveniente de zonas telencefálicas mediales (Olivier y col., 2001; He y col., 2001; García-López y col., 2010), al igual que esta subpoblación de subplaca, se realizaron reacciones inmunohistoquímicas contra este marcador. Sin embargo, no se observó colocalización, restringiéndose el marcaje de PDGFRalpha exclusivamente a la zona más ventral del telencéfalo (Figura 34 F). Esta población celular derivada de MMRT expresó en su totalidad el marcador palial Tbr1 (Figura 34 G). Además, algunas de estas células expresaron CR en áreas más próximas a la zona marginal y en la zona más interna de la preplaca en apertura, indistintamente (Figura 34 H,L). Por otro lado, se observaron células con expresión de Reln (Figura 34 I), e incluso otras presentaban colocalización entre ambos marcadores (CR y Reln; Figura

34 J-L). Este último caso se dio únicamente en las células que en E13 permanecían en la zona marginal, próximas a la superficie pial. Es importante mencionar que las células dispuestas horizontalmente en zona marginal y que expresan Reln, o Reln junto con CR se definen como células de Cajal-Retzius.

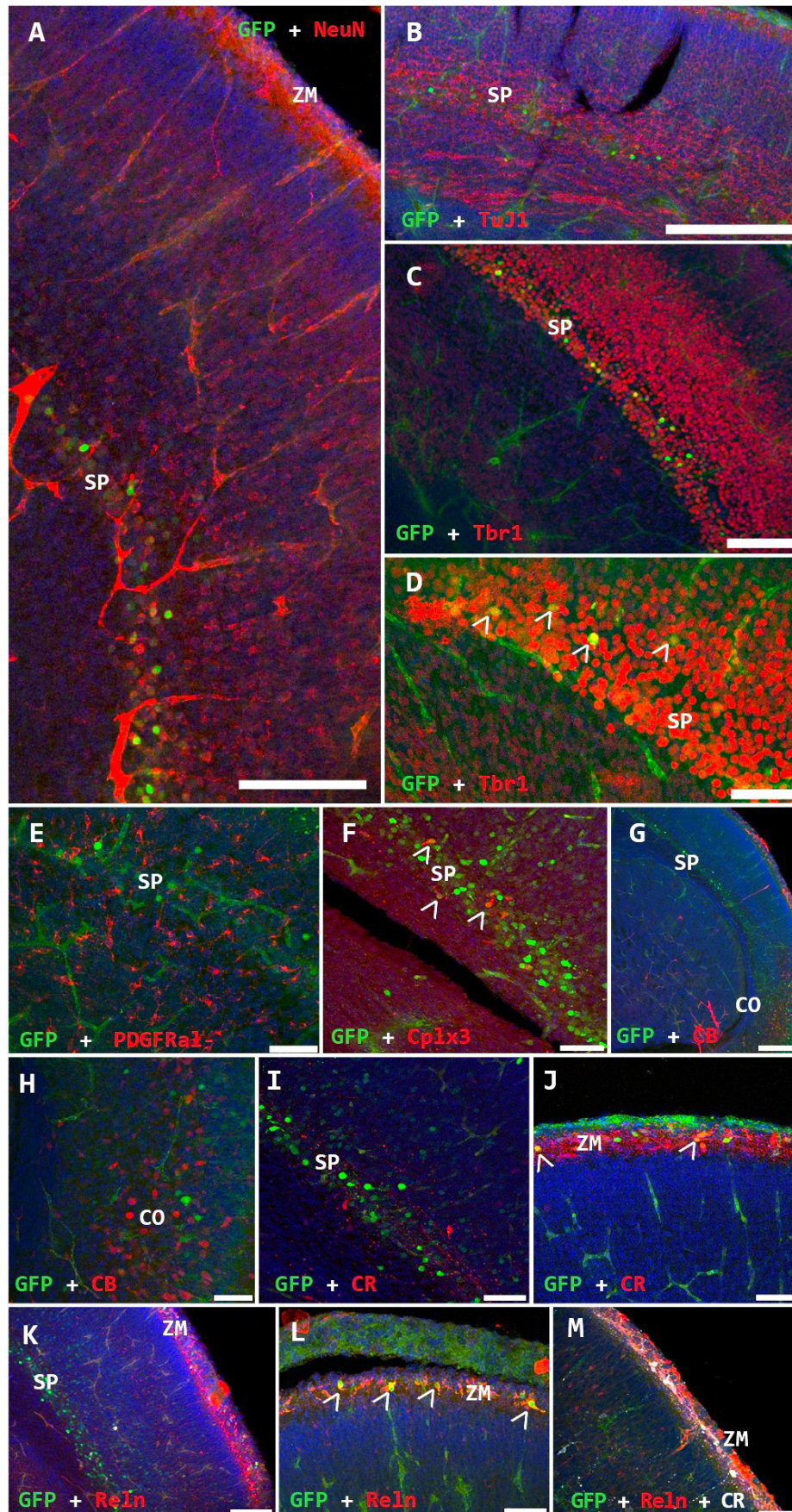
### Caracterización en estadio de E18

De nuevo, se realizó el trazado de la población celular cortical derivada de MMRT, en este caso mediante inyección y posterior electroporación *in utero* de un plásmido de expresión de GFP en E11. Se permitió la supervivencia de los embriones hasta E18, momento en el cual se realizó un estudio inmunohistoquímico (Figura 35).

En E18, los embriones se encuentran en estadio de placa cortical, esto es, tras la apertura de preplaca las células de la subplaca se disponen justo debajo de la placa cortical distinguiéndose bien de ésta y por lo tanto, facilitando su caracterización. En esta ocasión, se observaron células restringidas a la zona de subplaca y de nuevo en zona marginal, pero a su vez se encontró una población celular, más dispersa espacialmente que la población de subplaca, localizada en capas infragranulares (Figura 35 F).

Las células de subplaca derivadas de muro





**Figura 35.** Caracterización de las células derivadas de MMRT en E18. Inyección y posterior electroporación de GFP (verde) en MMRT, en embriones de 11 días. Caracterización inmunohistoquímica (rojo o blanco) en E18. (A-D) Las células derivadas de MMRT expresan en su

totalidad NeuN, TuJ1 (A,B) y Tbr1 (flechas en D), en subplaca (SP). (E) En este estadio el PDGFRalpha se expresa en el neuroepitelio cortical, pero ninguna célula CFDA (trazadas desde el MMRT) expresa este marcador. (F) La complexina3 (Cplx3) se expresa en alguna de las células derivadas de MMRT (flechas) asentadas en la SP. Además, se observan algunas células marcadas de CFDA que se encuentran en estratos superiores al de la SP en E18. (G,H) La calbindina (CB) se expresa en subpalio (corteza olfativa, CO) y a nivel palial, sólo en SP. Las células marcadas con CFDA no expresan CB en CO (H). (I,J,M) En E18, existen pocos cuerpos celulares en SP que expresan CR, aunque se aprecian fibras marcadas (I); además, ninguno de estos cuerpos está marcado con el trazador CFDA. En la zona marginal (ZM), sigue existiendo colocalización de CFDA y CR (flechas en J,M), al igual que sucedía en E13. (K,L) La expresión de relina (Reln) se restringe a la ZM de corteza y las células derivadas de MMRT que permanecen en este área, también expresan el marcador (flechas en L). Secciones coronales; la línea media está a la izquierda y la parte dorsal está arriba. El tejido fue contrateñido con bisbencimida (azul). Escalas: A-C, K: 50 µm; D- F, H- J, L, M: 25 µm; G: 100 µm.

expresaron en E18 NeuN, TuJ1 y Tbr1 (Figura 35 A-D). La expresión del marcador PDGFRalpha, que en E13 se observó únicamente en subpalio, en E18 apareció en neuroepitelio cortical, pero ninguna de las células derivadas de MMRT expresó este marcador glial (Figura 35 E). Se estudió también en este estadio la expresión del marcador de subplaca y capas V/VI, Complexina 3 (Cplx3), observándose como algunas células CFDA+ presentaron colocalización con éste (Figura 35 F). La expresión de CB en E18 se restringe a corteza olfativa, de tal modo que no se estudió su colocalización en neocorteza (Figura 35 G,H). En cualquier caso, las células olfativas marcadas con CFDA no presentaron tampoco expresión de CB en este área. A diferencia de lo advertido en la expresión de CR en E13, en este estadio embrionario más tardío, las células derivadas de MMRT fueron inmunorreactivas a este marcador, mayoritariamente en zona marginal (Figura 35 J,M). Sin embargo, no se observaron muchos cuerpos celulares CR+ en subplaca sino más bien fibras, aparentemente restringidas a esta

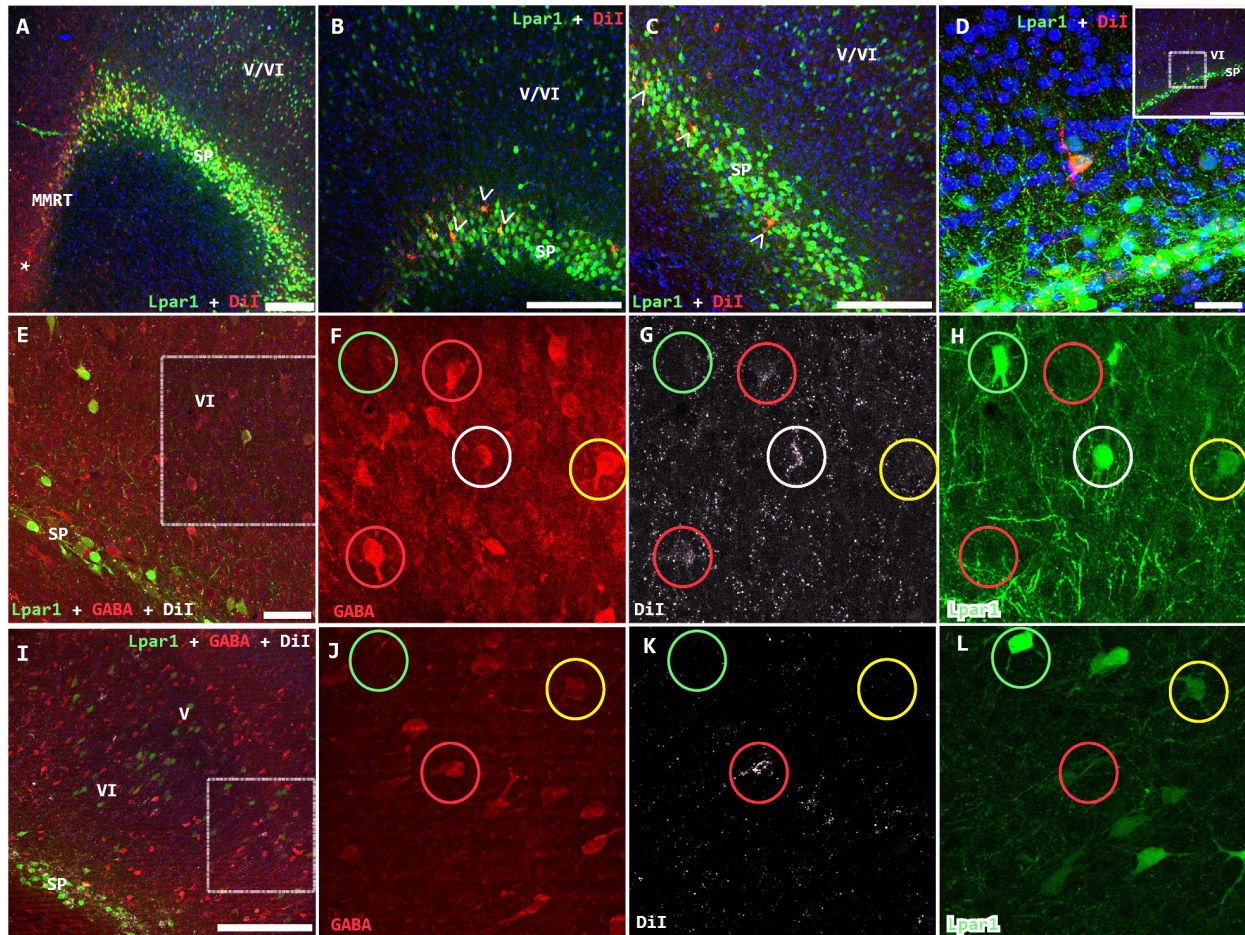
capa. Además, estos pocos cuerpos celulares CR+ no parecieron estar marcados con CFDA (Figura 35 I). La expresión de Reln no mostró cambios con respecto a la observada en E13, ya que, junto con la CR, se limitaba a zona marginal, donde presentaron colocalización con las células CFDA+ (Figura 35 K-M).

### Caracterización en P8

Siguiendo la misma línea que en los dos apartados anteriores, se realizó un trazado en E11 de las células derivadas de MMRT y establecidas en corteza, pero en esta ocasión permitiendo el nacimiento y desarrollo de los ratones inyectados hasta P8 (Figura 36). El trazador utilizado fue Dil en disolución. Aunque difuso, debido al marcaje granular típico del Dil cuando se utiliza *in vivo*, se siguen observando células no sólo en subplaca, sino también en capas V y VI. Es decir, confirmamos la existencia de células que se mantienen presentes en capas infragranulares, al igual que sucedía en E18.

Para esta caracterización, además, se utilizó un ratón transgénico que expresa la





**Figura 36. Caracterización de las células derivadas de MMRT en P8.** Inyección en MMRT de DiI (rojo: A-C; blanco: E-L) en E11 y posterior estudio en P8, sobre ratones transgénicos Lpar1-GFP (células que expresan Lpar1 en verde). (A-C) Las células Lpar1 (verde) en este estadio postnatal se encuentran en subplaca (SP) y capas infragranulares (V/VI). El asterisco (A) marca la zona de inyección en el embrión. Algunas de las células derivadas de MMRT expresan Lpar1 en el estrato de SP y en las capas V/VI (flechas en B y C; D). (E-L) Algunas de las células derivadas de MMRT (blanco) coexpresan GABA (rojo) y Lpar1 (verde) en capas infragranulares (círculo blanco). Otras expresan sólo GABA y no Lpar1 (círculos rojos). Y las hay que expresan Lpar1 y GABA pero no están marcadas con DiI (círculos amarillos) o sólo Lpar1 (sin GABA, círculos verdes). Secciones coronales; la línea media está a la izquierda y la parte dorsal está arriba. El tejido fue contrateñido con bisbencimida (azul). Escalas: A: 100  $\mu$ m; B, C, I: 50  $\mu$ m; D, E: 25  $\mu$ m.

proteína fluorescente GFP bajo el promotor de Lpar1 (también llamado Edg2), receptor ácido lisofosfatídico perteneciente a la superfamilia de los receptores acoplados a proteínas G. La expresión de este receptor se da específicamente en subplaca, y en capas infragranulares, al igual que sucede con

las células derivadas de MMRT. De hecho, parte de las células Lpar1+ se observaron marcadas con DiI, esto es, provinieron del MMRT (Figura 36 A-D).

Se eligió esta edad de estudio ya que es válida para detectar la presencia de interneuronas mediante la detección inmunohistoquímica

de GABA (Lavdas y col., 1996). Si ésta se realiza previamente en el desarrollo, nos podríamos encontrar con que en realidad no se trata de interneuronas debido a la dualidad del neurotransmisor GABA. Por lo tanto, se realizó una inmunohistoquímica contra GABA observándose cierta colocación con el Dil (células provenientes de MMRT; Figura 36 E-L, círculos rojos y blancos) sobre todo en capas infragranulares y no tanto en subplaca. Además, se encontraron células en estas capas V y VI derivadas de MMRT que no sólo expresaban GABA, sino también Lpar1 (Figura 36 E-H, círculos blancos). Por otro lado, se observaron células Lpar1+/GABA+ sin presencia de Dil (Figura 36 E-L, círculos amarillos), aunque cabe mencionar que no todas las células Lpar1+ fueron GABAélicas (Figura 36 E-L, círculos verdes).

## DISCUSIÓN





## **I. ESPECIFICIDAD DE MARCADORES EN DISTINTAS ÁREAS DURANTE EL DESARROLLO DEL TELENCEFALO**

La expresión de marcadores en las distintas poblaciones celulares telencefálicas varía durante el desarrollo embrionario y en el adulto. Esto podría estar relacionado y/o darnos una idea de la contribución celular por parte de distintas áreas germinativas, el agrupamiento de poblaciones celulares en áreas determinadas, o bien mostrarnos fenómenos de silenciamiento o nueva expresión de marcadores específicos.

### **A. RESTRICCIÓN DE MARCADORES DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO DE CORTEZA OLFATIVA**

La formación de la corteza olfativa primaria comienza pronto en el desarrollo, siendo la primera estructura en formarse en el telencéfalo. Comprende varias estructuras (corteza piriforme, tubérculo olfativo y corteza entorrinal) que están formadas por muchas poblaciones celulares originadas en diversas áreas del telencéfalo (García-Moreno y col., 2008), lo que confiere a cada estructura una enorme variabilidad fenotípica. De ese modo, era de esperar que los diferentes marcadores analizados no fuesen expresados de un modo constante a lo largo de todo el desarrollo. Previamente se había demostrado que en estadios embrionarios tempranos, marcadores como el Tbr1, la Reln y la CR se expresan de manera específica en la presuntiva corteza piriforme,

mientras que la CB se expresa en el área embrionaria que va a dar lugar al tubérculo olfativo (García-Moreno y col., 2008). En esta tesis, se ha realizado un análisis temporal de estos marcadores, desde estadios murinos tempranos hasta el adulto.

La expresión de Tbr1 es relativamente constante a lo largo del desarrollo, e inicialmente se expresa en la presuntiva corteza piriforme antes de limitarse de manera específica a las capas II y III de esta estructura adulta. La expresión de CR también es constante a lo largo del desarrollo, pero se restringe a la capa II y al tracto olfativo lateral (capa I) en la corteza olfativa adulta. Por el contrario, el marcaje de CB está ausente en la corteza olfativa embrionaria, pero pasa a expresarse en corteza piriforme adulta (capa III). Por otro lado, se observó una fuerte expresión de Reln en estadios embrionarios tempranos y se hacía difusa en estadios más tardíos.

En resumen, dado que la expresión de Tbr1 y CR permanece constante a lo largo del desarrollo de la corteza olfativa, podemos considerarlos como marcadores válidos y útiles de estructuras específicas de la corteza olfativa. No se puede decir lo mismo de los marcadores CB y Reln, ya que su expresión fluctúa durante el desarrollo de la corteza olfativa (Figura 37).



	<b>E12</b>	<b>E14</b>	<b>E18</b>	<b>Adulto</b>
<b>Tbr1</b>	CP	CP rostral	CP y End	Capas II/III CP
<b>CR</b>	CP	CP y tol	CP y tol	Capa II CP y tol
<b>CB</b>	TO	TO	End	Capa III CP
<b>Reln</b>	CP externa	CP interna	Difuso	Difuso

**Figura 37.** Distribución de distintos marcadores de corteza olfativa y su evolución durante el desarrollo embrionario y postnatal. Abreviaturas: CP: corteza piriforme; End: núcleo endopiriforme; tol: tracto olfativo lateral.

### B. TBR1 COMO FIABLE MARCADOR ESTRUCTURAL, PERO NO COMO MARCADOR FIABLE DE CÉLULAS DERIVADAS DE PALIO

Los orígenes de diversas estructuras cerebrales siguen siendo un tema polémico, en parte porque muchos estudios están basados en la utilización de marcadores específicos cuya expresión puede fluctuar a lo largo del desarrollo; no por migración celular sino por aparición/desaparición de marcaje. En esta tesis se propone que estos métodos de trazado actuales son inadecuados, y como tal, se ha estudiado el desarrollo de dos poblaciones específicas, derivadas de palio y subpalio. Aunque la técnica de la electroporación impregna un área más extensa que la estrictamente marcada utilizando trazadores (como el CFDA) o retrovirus, es una aproximación experimental útil, que permite conocer el origen exacto de las células marcadas para ser identificadas (asegurando que se marca un origen palial o subpalial, pero no

ambos), lo cual no sería posible utilizando los métodos, citados arriba, por pérdida de marcaje o silenciamiento. Así, esta técnica ofrece el poder analizar la migración de algunas poblaciones celulares desde sus lugares de generación hasta su destino final en la corteza olfativa.

Con todo ello, utilizando esta metodología se demuestra que, a pesar de que el Tbr1 haya sido propuesto como un marcador específico de células derivadas de palio (Puelles y col., 2000), la corteza olfativa contiene muchas células de origen palial que no expresan este marcador. Por otra parte, encontramos que hay muchas células originadas en estructuras subpaliales que expresan este marcador en la corteza olfativa. De esta manera, nos damos cuenta de la importancia de utilizar métodos de trazado celular para determinar el origen de distintas poblaciones celulares, en lugar de fiarlo todo únicamente al patrón de expresión de marcadores celulares específicos.

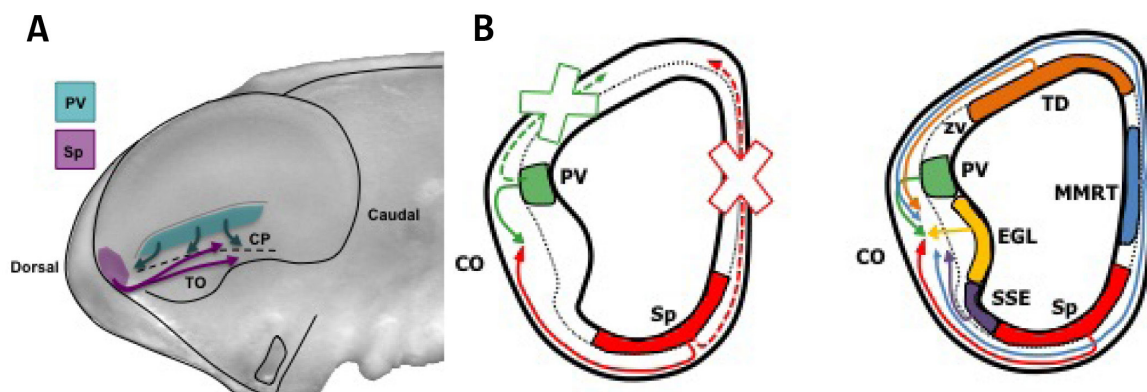
## II. EL PALIO VENTRAL Y EL SEPTUM COMO DOS NUEVAS ÁREAS DE GENERACIÓN DE CÉLULAS DE LA CORTEZA OLFATIVA

Se estudia sistemáticamente el comportamiento migratorio de las poblaciones celulares tempranas generadas en el palio ventral y en el área septal, identificando estas áreas como nuevas fuentes de células de la corteza olfativa además de las ya descritas previamente (García-Moreno y col., 2008). Por otro lado, se demuestra que las células generadas en palio ventral y septum durante el estadio de preplaca (E10-E12) no transgreden el borde palio-subpalio, por lo que no entran en el neuroepitelio cortical (Figura 38).

### A. CÉLULAS OLFATIVAS GENERADAS EN EL PALIO VENTRAL Y EL SEPTUM

Las presentes observaciones demuestran que las primeras células generadas en el área septal invaden la corteza olfativa en E11, aunque no alcanzan el palio medial o la preplaca cortical. La caracterización inmunohistoquímica de las células marcadas en nuestros experimentos sugiere la coexistencia de tres subpoblaciones: células CB+/Tbr1+ (que representan el 40% de las células marcadas), y las subpoblaciones CR+/Tbr1+ y Reln+/Tbr1+ que constituyen el 60% restante.

De un modo similar, las células generadas en E11 en palio ventral migran radialmente hacia la superficie pial adyacente para ocupar la corteza piriforme desde donde,



**Figura 38.** (A) Dibujo que representa el cerebro embrionario completo, mostrando las migraciones celulares desde el septum (Sp) y el palio ventral (PV). (B) Esquema indicando las áreas que dan lugar a distintas poblaciones celulares de la corteza olfativa (CO), basado en un estudio reciente de nuestro grupo (García-Moreno et al., 2007) y que se ha completado añadiendo las dos nuevas áreas identificadas en el transcurso de esta Tesis: el palio ventral (PV) y el septum (Sp). Estas migraciones están integradas en el esquema de la derecha y permanecen separadas a la izquierda. Las cruces indican rutas de migración hacia el telencéfalo dorsal (TD) no utilizadas por las poblaciones generadas en estas áreas. Abreviaturas: zv: zona ventricular; EGL: eminencia ganglionar lateral; SSE: surco septo-eminencial; CP: corteza piriforme; TO: tubérculo olfativo.



mediante desplazamientos tangenciales, se desplazan caudalmente a lo largo del eje antero-posterior del cerebro para ocupar la extensión completa de la corteza piriforme, sin invadir el tubérculo olfativo. La caracterización inmunohistoquímica de las células generadas en palio ventral revela una coexpresión pequeña de los distintos anticuerpos ensayados con el trazador CFDA, lo que sugiere que en estadios tempranos del desarrollo estas células no se diferencian en el manto de la eminencia ganglionar lateral, y que los marcadores celulares analizados son producidos únicamente en la capa mas externa de la corteza olfativa. Muchas de las células diferenciadas expresan *Tbr1* y *CB*, marcadores típicos de regiones paliales y subpaliales, respectivamente, sugiriendo un linaje mixto en la frontera palio-subpalio. De hecho, tres linajes genéticos distintos habían sido descritos previamente en este área (palial, subpalial y mixto; Carney y col., 2006). Estos hallazgos son confirmados mediante el análisis postnatal de los embriones que fueron inyectados con trazadores fluorescentes utilizando un sistema guiado por ultrasonidos.

Basándonos en estos resultados, se puede inferir que se generan más células de corteza olfativa en el palio ventral que en el septum. Esto se puede deber a las diferentes distancias migratorias asociadas con cada región, aunque las contribuciones celulares desde la misma área deben diferir dependiendo de la ruta migratoria tomada, como se describe

para el muro medial rostral telencefálico (García-Moreno y col., 2008), desde el cual surge una población minoritaria dorsal y una población mayoritaria ventral hacia corteza olfativa. Cabe aclarar que dados los métodos de trazado utilizados sólo podemos referirnos a poblaciones migratorias sin cuantificar, ya que en cada experimento de trazado se marcan diferentes números de células en cada área.

Varios autores han propuesto que existen células olfativas generadas en el palio y en el septum. De hecho, ya se había descrito previamente en el laboratorio de Juan De Carlos una población celular originada en la eminencia ganglionar lateral que migra a la corteza olfativa (De Carlos y col., 1996; García-Moreno y col., 2008) mostrando que las poblaciones celulares olfativas son generadas también en la zona palial de esta estructura, el palio ventral. Posteriormente, esta corriente migratoria lateral es reconocida (Carney y col., 2006) como portadora de células hacia la corteza olfativa y la amígdala desde la frontera palio-subpalio (Stoykova y col., 2000; Yun y col., 2001). Sin embargo, hay que puntualizar que estos análisis fueron llevados a cabo en estadios del desarrollo más tardíos que los de la presente tesis.

### **B. EL PALIO VENTRAL Y EL SEPTUM NO SON FUENTES DE NEURONAS CORTICALES**

Varios estudios han propuesto al septum y al palio ventral como fuentes de interneuronas

corticales (Bielle y col., 2005; Gelman y col., 2009; 2011), aunque estos trabajos pueden llevar a confusión debido a la dificultad en la discriminación anatómica entre el septum y el área preóptica en los ratones embrionarios. En adulto, estas dos zonas se encuentran contiguas pero ocupando distintas áreas en el eje rostro-caudal telencefálico, mientras que en los embriones estas áreas proliferativas son muy difíciles de discernir y pueden ser consideradas como una única entidad. En consecuencia, las inyecciones de trazadores *in utero* en la región septal en embriones en E11 marcan tanto el septum como el área preóptica y, usualmente, dan lugar al trazado de las poblaciones celulares que nacen de ambas regiones. En nuestro trabajo demostramos que estas células no entran en el manto cortical en estadio de preplaca (E10-E12), lo que es consistente con trabajos previos (Rubin y col., 2010). Aunque los experimentos que mostramos apuntan a los mismos resultados en estadios más tardíos, simplemente podemos sugerir y no afirmar que las células no entran en corteza en estos estadios, debido a la posible pérdida de marcaje del trazador CFDA después de sucesivas divisiones celulares.

Basándose en el patrón de expresión de marcadores específicos (Gelman y col., 2009; 2011), varios autores han propuesto que el área preóptica embrionaria es un lugar de generación de interneuronas corticales, mientras que otros han sugerido la migración, no sólo de interneuronas, sino también de

células glutamatérgicas transitorias desde el palio ventral a neocorteza (Teissier y col., 2010). Además, un estudio analizando la expresión temporal de Dbx1 (Gelman y col., 2011), utilizándolo como supuesto marcador específico de células de Cajal-Retzius, propone el palio ventral también como fuente de células de Cajal-Retzius. De cualquier modo, las aproximaciones metodológicas utilizadas en nuestro trabajo (tres tipos de trazado), muestran un rechazo absoluto a esta hipótesis.

### C. LOS MARCADORES PALIALES Y SUBPALIALES COMUNMENTE UTILIZADOS NO SON ALTAMENTE ESPECÍFICOS

Tbr1 es un marcador descrito (Hevner y col., 2003) y ampliamente aceptado como palial. Constatamos en nuestros trabajos que era expresado en prácticamente todas las células originadas en el septum, el cual es considerado un territorio subpalial (Puelles y col., 2000). Es posible que una inyección de trazador en la región septal marque poblaciones celulares desde ambas regiones: la palial y la subpalial, lo que podría explicar este resultado sorprendente. Se ha demostrado que las células desde el muro medial rostral telencefálico, estructura dorsal al septum, migran a través de la región septal mediante un desplazamiento ventral, y que un porcentaje de estas células expresan Tbr1 (García-Moreno y col., 2008). Alternativamente, las células generadas en el área septal pueden expresar marcadores

tanto subpaliales como paliales. De hecho, el Dbx1, un marcador típico de palio ventral, también se expresa en la región septal (perteneciente a subpalio), al igual que ocurre con p73, otro marcador de palio ventral, el cual también se expresa en las células que derivan de palio medial y lateral (Bielle y col., 2005; Meyer y col., 2002; Meyer y col., 2004; Takiguchi-Hayashi y col., 2004; Zimmer y col., 2010).

Como parte del área palial, todas las células derivadas del palio ventral se espera que expresen Tbr1. De todos modos, hemos encontrado que este caso se da en menos del 50% de las células derivadas de esta región. Aunque varios marcadores son habitualmente utilizados cuando se pretenden marcar células desde fuentes paliales a subpaliales, los presentes descubrimientos ponen de relieve la importancia de utilizar trazadores junto con los marcadores para poder atribuir orígenes celulares paliales, subpaliales o de otras regiones.

### III. ORIGEN EXTRA-CORTICAL DE LAS CÉLULAS DE LA SUBPLACA

Pese a estar mucho más que establecido, en la actualidad existe todavía un desconocimiento general acerca de la ontogenia de la subplaca. De hecho, a día de hoy, lo habitual es pensar que la “séptima” capa de la neocorteza deriva de la zona ventricular adyacente del mismo neuroepitelio cortical. En este trabajo apuntamos a una ruptura de este

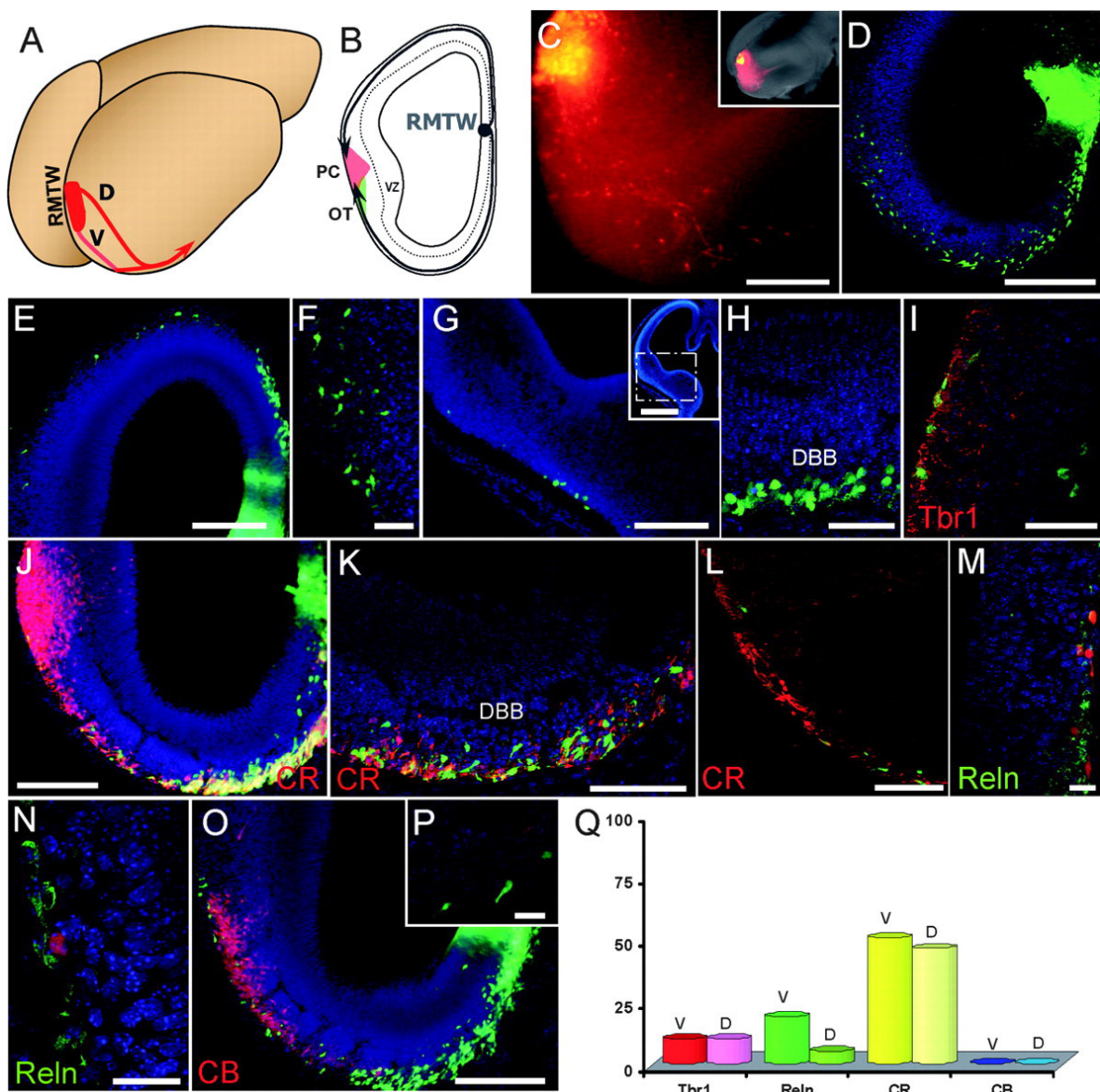
dogma, añadiendo una zona de generación extra-cortical y, por lo tanto, presentando un origen dual de la subplaca: el neuroepitelio cortical y el muro medial rostral telencefálico. Evidentemente, no es extraño pensar que exista una gran diversidad de orígenes para las distintas estructuras cerebrales. Actualmente, es conocido que la gran mayoría de estructuras encefálicas tienen un origen múltiple; de hecho los neurocientíficos actuales no se plantean poner en duda el aporte de células de proyección local o interneuronas a la corteza cerebral por parte del telencéfalo basal. Otra estructura telencefálica ontogénicamente heterogénea es la corteza olfativa que, al igual que la subplaca, recibe aporte celular en estadios tempranos por múltiples estructuras telencefálicas (García-Moreno y col., 2008; Ceci y col., 2012). Además, es importante mencionar que esta corteza no está formada sólo por células que migran radialmente desde su destino, sino también las hay que migran distancias variables, utilizando una migración tangencial tal y como sucede en la corteza cerebral. El caso de migración tangencial más larga se ha descrito para una población amigdalina cuya área de generación se encuentra fuera de la vesícula telencefálica, en el núcleo paraventricular hipotalámico, perteneciente al diencefalo (García-Moreno y col., 2010). Con los ejemplos anteriores junto con el estudio que acontece, se da más que establecido que cualquier estructura encefálica posee más de

un área de aporte celular, dando por lo tanto relevancia a la heterogeneidad ontogénica.

### A. EL MURO MEDIAL ROSTRAL TELENCEFÁLICO COMO ÚNICO ORIGEN EXTRA-CORTICAL DE LA SUBPLACA

El muro medial rostral telencefálico también es conocido como septum palial (Dixit y col., 2011), que en el adulto se transformará en la placa comisural anterior. Se trata por lo

tanto de una estructura palial y externa a la neocorteza. Colinda en su parte ventral con el septum subpalial y caudalmente con el cortical-hem. No es la primera vez que se describe que esta zona da lugar a células que alcanzan su destino siguiendo una migración tangencial, de hecho García-Moreno y colaboradores (2008; Figura 39) ya habían observado que desde el MMRT surgían



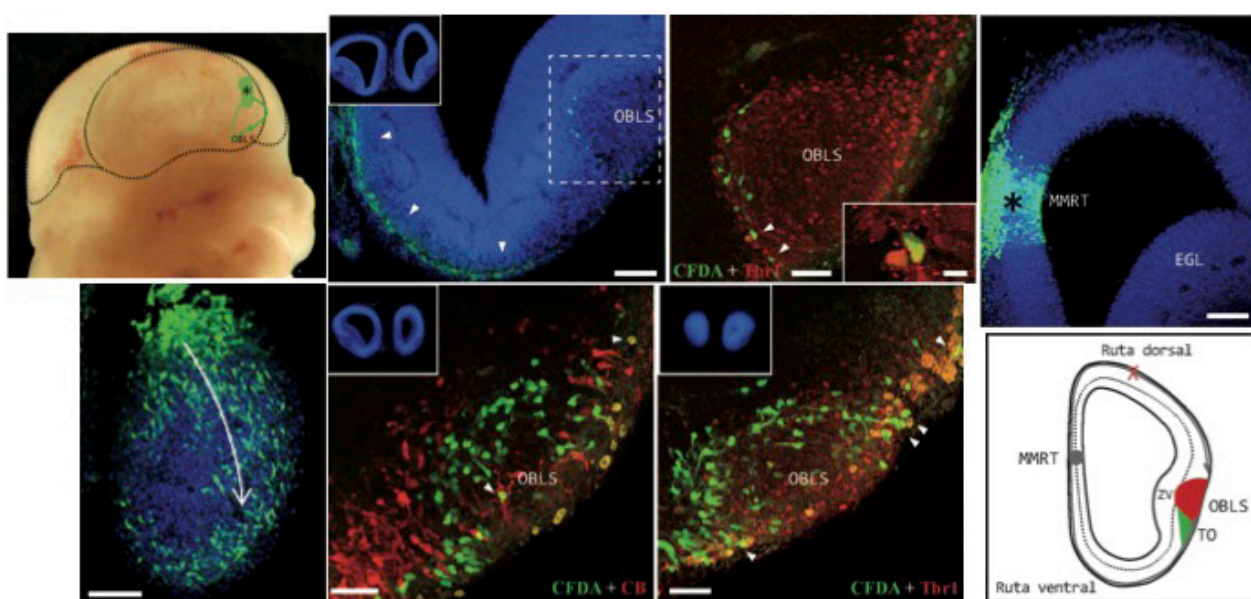
**Figura 39.** Figura tomada de García-Moreno y col., 2008 donde se observa una migración dorsal que surge del MMRT (RMTW de sus siglas en inglés; A,B,E). En Q se observa cómo esta población dorsal (D) no expresa prácticamente relina (Reln).



dos migraciones celulares tangenciales significativas: una dorsal y otra ventral. Ambas migraciones colonizaban la corteza olfativa en estadio de preplaca. Sin embargo, dado que la técnica de cultivo de embriones *in toto* utilizada para analizar estas migraciones no permitía largas supervivencias, fue imposible constatar que las poblaciones que migraban dorsalmente daban lugar a células de la subplaca que se establecían primeramente en la preplaca para segregarse y colocarse en la profundidad de la corteza cuando entran en escena las células de la placa cortical. Sin embargo, en estos trabajos pioneros se describió que un pequeño porcentaje de células con migración dorsal expresaban relina (pudiendo ser, en consecuencia, células de Cajal-Retzius); sin embargo, el porcentaje mayoritario correspondía a células que no expresaban relina, por lo que, es ahora cuando reconocemos que estas

células pertenecen a una subpoblación de la subplaca.

Con los estudios realizados en este trabajo y los previos realizados en el laboratorio, podemos asegurar que estas poblaciones celulares provenientes de MMRT siguen un camino dorsal. Las inyecciones en el septum no muestran una colonización medial de la neocorteza y por lo tanto los trazados realizados marcan únicamente a células generadas en esa misma estructura y no corresponden a células de paso. Es importante destacar en referencia a esto que, de nuevo en el laboratorio de De Carlos, Ceci (2010) observó en los mutantes Sey (no poseen Pax6) una pérdida de las poblaciones celulares que usan la ruta dorsal proveniente de MMRT (Figura 40). Si tenemos en cuenta que en estos mismos mutantes existe una disminución de células de la subplaca (Stoykova y col., 2003) y un defecto en



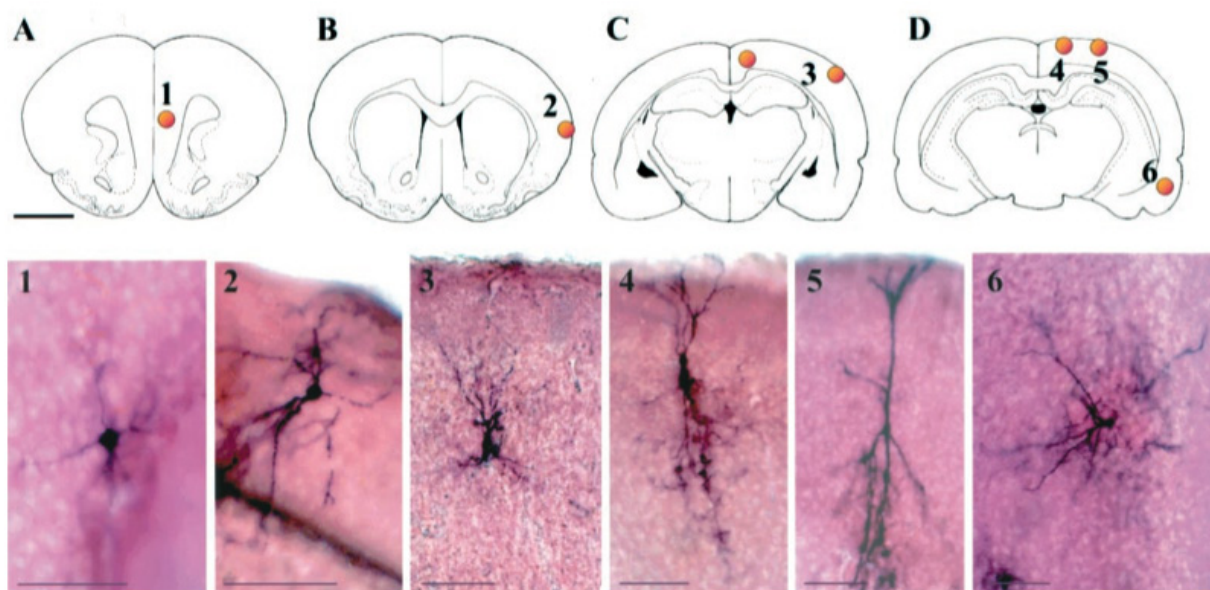
**Figura 40.** Figura tomada de Ceci y col., 2010 donde se observa la falta de migración dorsal procedente del MMRT en los mutantes con déficit en Pax6 (mutantes Sey).

la formación de las conexiones tálamo-corticales y cortico-talámicas (Molnar y col., 2003), podemos fácilmente relacionar la posible pérdida de una población de células de la subplaca, debido al fallo en la migración dorsal desde el MMRT, como consecuencia de la ausencia de Pax6.

Como se ha visto en los resultados obtenidos en este trabajo, una zona única, el MMRT, da lugar tanto a células de proyección como a interneuronas. En realidad, no es la primera vez que se propone algo así, y en el caso que se describe a continuación se da incluso a nivel de célula única. En el laboratorio de Walsh (Reid y col., 2002) se estudió, mediante la utilización de marcajes con virus, la presencia de clones mixtos derivados de áreas distintas, entre los cuales se observó un clon compuesto de células de proyección e interneuronas, cuya localización abarcaba

la zona más medial y rostral del telencéfalo, junto con capas bajas de corteza a lo largo de toda su extensión. Esto podría sugerir la generación de clones mixtos desde esta zona medial rostral, casando con los resultados aquí mostrados (Figura 41).

Encontramos que el MMRT no es la única área extra-cortical desde donde se generan células con un papel pionero como son las de la subplaca. Se ha observado una zona de telencéfalo medial, la corteza cingulada, donde se generan otro tipo de células pioneras distintas a la subplaca, éstas proyectan precediendo y guiando a los axones de las células que proyectan a través del cuerpo calloso (Koester y O'Leary, 1994). Por lo tanto, podemos decir que existe también una neurogénesis en esta área de palio medial similar a la que acontece en el MMRT.



**Figura 41.** Figura tomada de Reid y col., 2002 donde se observa, mediante inyección de retrovirus, un clon mixto que abarca las siguientes posiciones: MMRT, capas bajas de corteza cerebral y corteza olfativa, en secciones coronales.

Es conocido que la subplaca de ratón posee una ventana de generación que se da entre E10-E13 (Hoerder-Suabedissen y Molnar, 2012). En este trabajo observamos que la generación de las células procedentes que MMRT que colonizan la corteza se restringe a los estadios E10 y E11. Ya que en E12 no asciende ninguna célula a corteza, y sabiendo que las células de subplaca se generan entre E10-E13, pese a haber realizado los estudios de generación celular únicamente en E11 podemos extrapolar que si aproximadamente el 50% de las células procedentes de MMRT se genera en E11, el 50% restante se genera en un estadio previo. Lo mismo sucede con las células de capas V/VI, es decir, se cogen con las células de subplaca que también provienen de MMRT. Por otro lado, y atendiendo a la persistencia de esta población celular, nuestros resultados refutan los resultados previos que insinúan una desaparición postnatal de gran parte de las células de subplaca generadas en estadios tempranos (Price y col., 1997), al menos tal y como lo observamos hasta ocho días después del nacimiento.

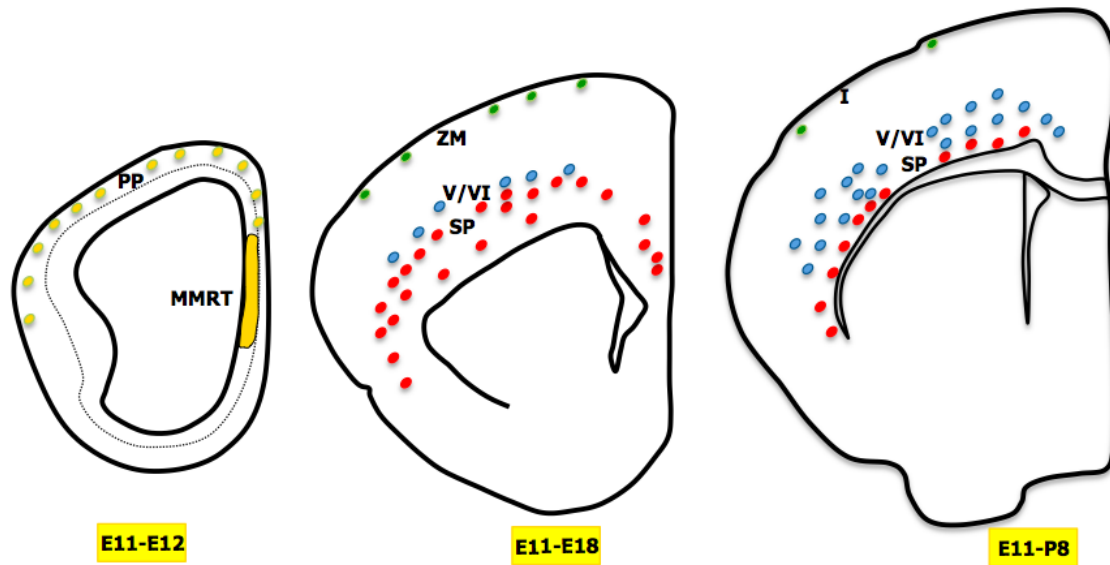
### **B. LA HETEROGENEIDAD FENOTÍPICA DE LA SUBPLACA SE REDUCE A UNA HETEROGENEIDAD ONTOGÉNICA**

Son muchos los trabajos previos que describen a la subplaca como una población muy heterogénea a nivel fenotípico (entre otros: Hoerder-Suabedissen y col., 2013; Hoerder-Suabedissen y Molnar, 2013; Oeschger y col., 2012), de hecho en la actualidad existen

grupos en los que su investigación se centra única y exclusivamente en el estudio de esta diversidad. En este sentido, es coherente que un estrato celular con una gama de funciones tan amplia como la descrita, posea tal diversidad. Y es por esta misma razón que, previo a este trabajo, todo apuntaba a que la subplaca podía poseer un origen múltiple. Si nos centramos en la población derivada del MMRT, podemos encontrar un número muy elevado de distintos subtipos neuronales, atendiendo a la presencia o ausencia de diversos marcadores. Pero es que además, no sólo hablamos de heterogeneidad en la inmunorreactividad, sino también en la tipología celular; esto es, a la existencia de células de proyección e interneuronas procedentes de un mismo origen. Podemos afirmar que existen, al menos, tres poblaciones distintas que surgen desde el MMRT: una pequeña población de células de Cajal-Retzius que se coloca subpialmente, en la zona marginal, y dos poblaciones de células muy heterogéneas fenotípicamente, la abundante población de células de la subplaca y otra mas minoritaria que ocupa las capas infragranulares corticales (Figura 42). A día de hoy, conocemos muchas estructuras compuestas por células provenientes de distintos orígenes, y es que cada día nos damos más cuenta que la mayor parte de la diversidad celular viene marcada por una diversidad ontogénica.

### **C. ORIGEN PALIAL DE CÉLULAS GABAÉRGICAS CORTICALES**



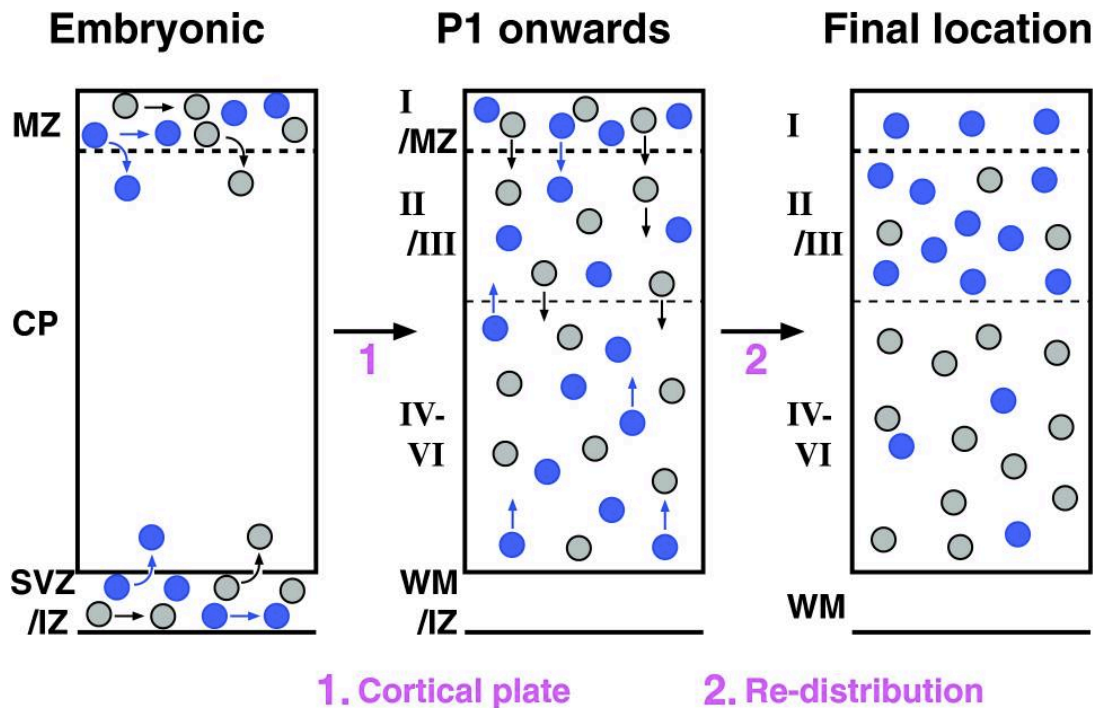


**Figura 42.** Dibujo representando hemisecciones coronales del cerebro de ratón a distintos estadios de su desarrollo, donde se observan las distintas poblaciones que surgen del muro medial rostral telencefálico (MMRT). En E12, las células derivadas de MMRT pueblan la preplaca (PP) a lo largo de toda su extensión. En E18, ya habiendo sucedido la apertura de subplaca, podemos observar tres poblaciones distintas: círculos rojos (células de subplaca, SP); círculos azules (células de capas infragranulares V y VI); y círculos verdes (células de Cajal-Retzius en la zona marginal, ZM). En P8 se observa un incremento proporcional en las células de capas V y VI, junto con una disminución de las de capa I (antes ZM).

En este trabajo se describe la migración tangencial de varias poblaciones celulares procedentes del MMRT cuyos destinos principales son la subplaca y las capas infragranulares corticales. Estamos viendo que, desde un área palial concreta, se generan células de proyección e interneuronas, con una expresión variada de marcadores, que van a poblar la misma estructura: la corteza cerebral. Hasta el momento, está establecido que las células GABAérgicas corticales provienen de estructuras ventrales subpaliales. Sin embargo, en este trabajo ponemos en entredicho este dato, ya que observamos que existe una población celular derivada de palio (del MMRT) que puebla la

corteza cerebral y expresa GABA. En apoyo a nuestros datos, vemos en la bibliografía que recientemente se sugiere la existencia de una población de interneuronas corticales provenientes de palio (Cai y col., 2013), aunque estas observaciones se realizaron *in vitro* y nosotros podemos demostrarlo *in vivo*.

Con respecto a la incorporación de interneuronas a la corteza en desarrollo, en el laboratorio de Fishell (Miyoshi y Fishell, 2011) observaron la ascensión de interneuronas, tras una especie de “periodo de espera” en capas bajas. Esto es, las interneuronas se generaban en estadios tempranos, alcanzaban la corteza y era en



**Figura 43.** Dibujo tomado de Miyoshi y Fishell, 2011 que representa la colocación de las interneuronas en el espesor de la corteza cerebral, tras su llegada por migración tangencial, en estadios postnatales.

estadios posteriores cuando ascendían o descendían a sus correspondientes capas mediante migración radial (Figura 43). Esto es relevante, ya que en nuestros trabajos observamos un aumento de células en capas infragranulares (no de subplaca) en estadios postnatales, pese a saber que se generan en el MMRT en estadios tempranos. Este dato, en cierto modo podría corroborar la hipótesis de estas observaciones previas.

Por otro lado, se ha descrito que algunas células de subplaca, desde su localización en la profundidad de capa VI, realizan contactos sinápticos con las células de Cajal-Retzius en la zona marginal/capa I (Myakhar y col., 2011). De manera similar, podríamos pensar que las células de capa V/VI generadas en el MMRT podrían tener algún tipo de

contacto con las células de proyección de la subplaca. Precisamente el compartir su origen quizá nos esté indicando una estrecha relación funcional más tardía y pasaría a ser menos descabellado el hecho de semejante heterogeneidad procedente de un único origen.

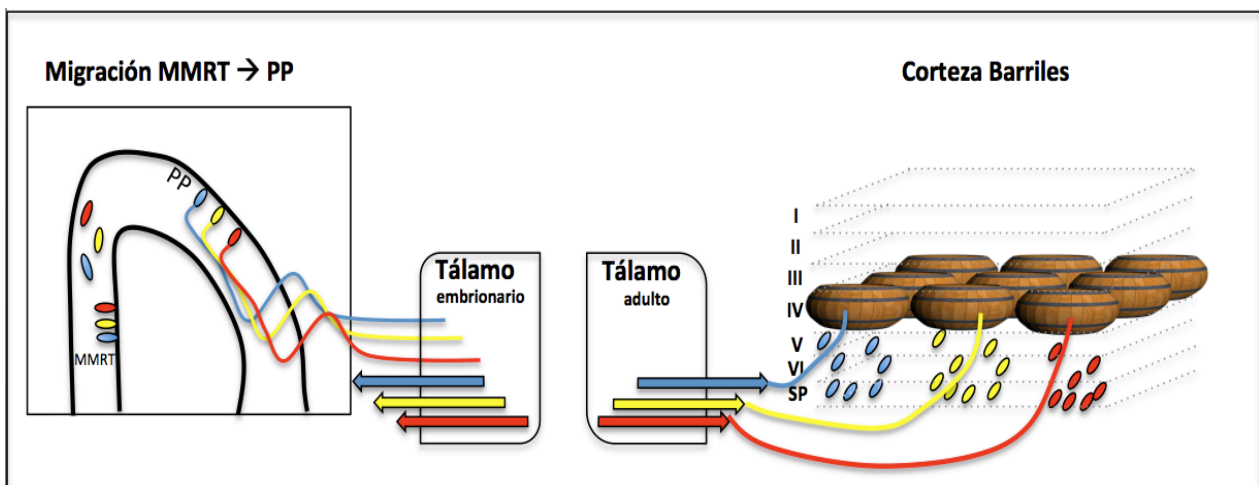
#### D. MIGRACIÓN TANGENCIAL DE CÉLULAS CORTICALES DE PROYECCIÓN

Como ya hemos mencionado y ha sido descrito (Ghosh y col., 1990; De Carlos y O'Leary, 1992), las células de la subplaca poseen un papel muy importante en el establecimiento de las proyecciones cortico-talámicas. Esto viene refrendado por la observación de que la gran mayoría de células de la subplaca son células de proyección. Por lo tanto, no es de extrañar que este nuevo

origen de generación descrito, el MMRT, de lugar a células de axón largo. Previo a realizar estudios más complejos, en este trabajo ya podemos indicar que parte de las células provenientes de MMRT son de proyección, puesto que colocan con marcadores tales como la Cplx3, exclusivo de células que proyectan subcorticalmente. Posteriormente esta particularidad se reafirma observando, no sólo su morfología, sino también mediante el uso de trazadores axonales. Asimismo, nuestros estudios corroboran el dato de que las células de subplaca estén proyectando sus axones fuera de corteza mucho antes que cualquier otra célula cortical no perteneciente a subplaca. Pero lo importante en este apartado no es que observemos células de proyección originadas

en una estructura palial (MMRT), sino que las células alcancen su destino cortical migrando tangencialmente. Es la primera vez, por lo tanto, que se describe el uso de la migración tangencial por parte de células de proyección corticales.

Quizá el aporte tangencial tanto de células de proyección como de interneuronas, nos esté indicando un aporte de heterogeneidad a una capa cortical con funciones tan diversas como es la subplaca. Podríamos llegar a hipotetizar una función en la formación de barriles o incluso columnas visuales, donde el aporte no sólo local (radial) sino también tangencial desde MMRT, podría estar jugando un papel importante en la diversificación y separación funcional de cada uno de estas áreas corticales (Figura 44).



**Figura 44.** Dibujo que representa la hipótesis del aporte de heterogeneidad a la corteza de barriles por parte de las células provenientes de MMRT. Se muestra cómo cada grupo celular (células azules, amarillas o rojas) migran desde el MMRT hacia preplaca (PP). Una vez allí, los axones de algunas células de subplaca empiezan a proyectar subcorticalmente (De Carlos y O'Leary, 92) y podrían ser utilizados por los axones tálamo-corticales que empiezan a entrar en el neuroepitelio cortical, a modo de guías para alcanzar un área específica de esta corteza, como describieron Molnar y Blackemore (Handshake theory, 1990), lo que ayudaría a la formación de los barriles en capa IV de corteza sensorial. Ya en el adulto, cada grupo celular (de subplaca o de capas infragranulares) corresponderá, o se limitará, a un barril determinado, adquiriendo por lo tanto, una subfunción específica.

### IV. APROXIMACIONES METODOLÓGICAS PARA LA MEJORA DEL TRAZADO DE POBLACIONES CELULARES CONCRETAS

Son varias las aproximaciones experimentales que se llevan a cabo en este campo con la finalidad de trazar las distintas poblaciones celulares migratorias. Obviamente, cada ámbito en neurociencia tiene sus limitaciones metodológicas, y es por ello por lo que a lo largo de la realización de esta tesis se han llevado a cabo intentos de mejora de las técnicas de estudio habituales en el laboratorio para el trazado de poblaciones celulares migratorias que, por el interés que puedan tener, comentamos a continuación.

En primer lugar, se debe tener en cuenta que el abordaje de trazado de cada una de las poblaciones celulares depende en gran medida de la finalidad de nuestro estudio. Por ejemplo, utilizaremos distintos tipos de trazado para estudiar el comportamiento de una población en estadio embrionario, en el momento del nacimiento o si estamos interesados en hacer un seguimiento de su desarrollo postnatal. En este último caso necesitaríamos utilizar un trazador más estable en el tiempo, debido a la dilución que pudiera sufrir como consecuencia de las distintas divisiones celulares a las que se ven sujetas todas las células embrionarias.

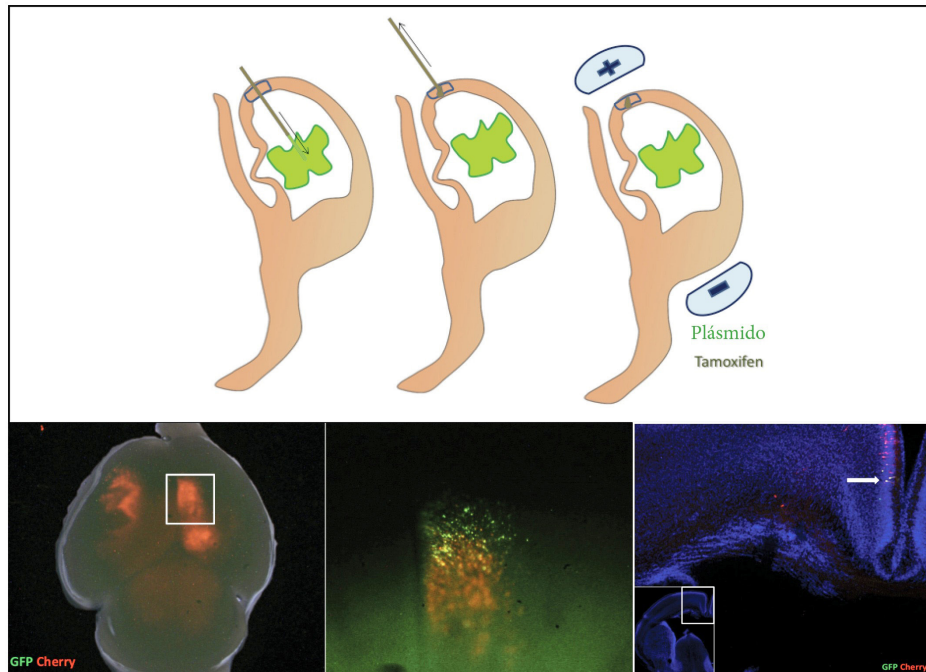
Por otro lado, cabe mencionar que nuestros estudios previos de migraciones apuntan

a orígenes múltiples de las distintas estructuras. Esto es importante, dado que en la mayoría de los casos, las migraciones se trazan mediante electroporación de la sonda con el trazador y esta técnica no permite, en material embrionario, la focalidad que se desearía para aislar áreas germinativas y, por tanto, marcajes selectivos de poblaciones celulares aisladas. Por ello, a continuación introducimos nuevas metodologías puestas en práctica en el transcurso de esta tesis ideadas para permitirnos marcar áreas específicas sin contaminaciones, así como para tratar de no perder la señal del marcador en las células que se han dividido varias veces con el paso del tiempo.

#### A. FOCALIDAD MEDIADA POR INYECCIÓN LOCAL DE TAMOXIFEN

Este método se basa en la electroporación *in utero* de una mezcla de plásmidos recombinantes. Estos son: pCAGG- LoxP- mCherry- LoxP- GFP y pCAG-ERT2CreERT2 (este último se induce por el fármaco Tamoxifen). En este tipo de experimentos es habitual la inyección intraperitoneal de tamoxifen cuando deseamos inducir la expresión plasmídica pero, en este caso, hemos realizado una importante modificación al añadir el tamoxifen directamente en el tejido nervioso embrionario, en el momento de la inyección de los plásmidos, la cual se realiza *in utero* guiados por ecografía de ultrasonidos.

Los pasos son (Figura 45):



**Figura 45.** Focalidad del trazado celular conseguida mediante inyección en tejido de tamoxifen. Arriba: esquema mostrando la aproximación metodológica utilizada. Se inyecta la mezcla plasmídica pCAGG-LoxP-mCherry-LoxP-GFPypCAG-ERT2CreERT2 en ventrículo y el tamoxifen al retirar la pipeta, en un área pequeña de tejido. Se electropora guiando el marcaje hacia el depósito de tamoxifen. Abajo a la izquierda: vista dorsal de un cerebro inyectado con la mezcla plasmídica en los ventrículos. Abajo centro: electroporación consiguiendo focalidad en las células que expresan GFP inducidas por tamoxifen sólo en el área donde se ha depositado este. Abajo a la derecha: corte coronal en el que se observan las pocas células GFP positivas (flecha) obtenidas frente a las mCherry positivas.

1º Inyectamos la mezcla plasmídica en ventrículo.

2º Al extraer la micropipeta, soltamos el tamoxifen en tejido, en muy poca cantidad. De este modo, el tamoxifen llevará a cabo su función únicamente en un área concreta, induciendo la expresión de la Cre y por lo tanto, eliminando la expresión de mCherry, momento en el cual pasa a expresarse exclusivamente el GFP. De esta manera, se restringe la expresión del trazador a un área focal de interés y no a la adyacente.

3º Electroporamos la mezcla plasmídica, colocando los electrodos de tal manera que

se direcciona la captación de los plásmidos hacia el área en donde se encuentra el depósito de tamoxifen.

En principio, ésta parece ser una aproximación eficiente para resolver el problema de la focalidad espacial. Además, mediante esta metodología se puede comparar el aporte de poblaciones celulares entre áreas adyacentes.

## B. FOCALIDAD MEDIADA POR INYECCIÓN DE COLÁGENO

El colágeno es un material que varía su viscosidad en función de la temperatura. En frío, el colágeno se encuentra



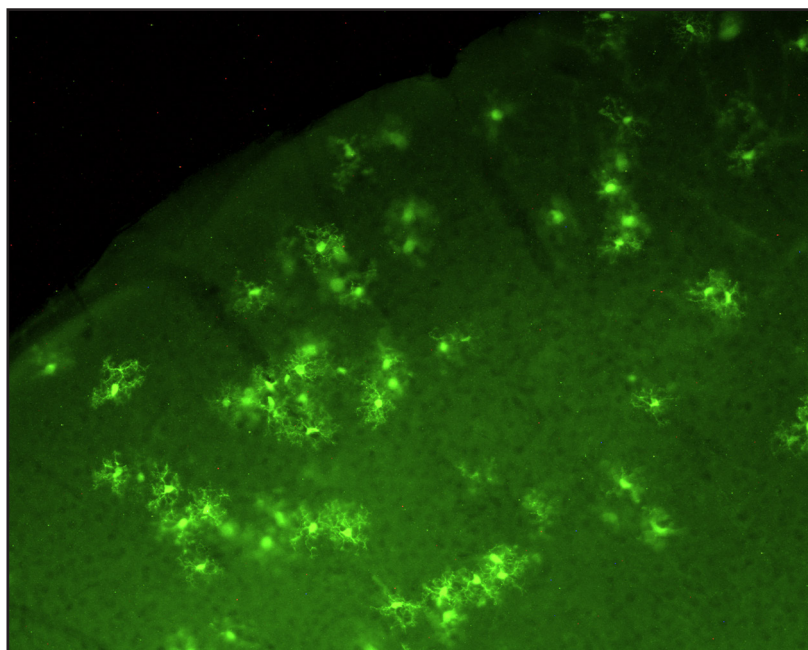
despolimerizado y por lo tanto, líquido. En calor (37°C), el colágeno pasa a estar más viscoso, ya que se polimeriza, y actúa como una bola de agarosa. Se mezcla, por lo tanto, una solución plasmídica con el colágeno en frío, tras lo cual se inyecta *in utero*, en la zona ventricular cortical, ayudados ecográficamente. Teniendo en cuenta que el embrión se encuentra a 37°C, el colágeno se polimeriza, reteniendo y conservando agrupado el conjunto de plásmidos inyectados. De esta manera, al hacer la electroporación, se consigue que el plásmido embebido en el colágeno se transfecte a las células de un área muy concreta, en el lugar donde ha quedado depositada la bola de colágeno.

Las pruebas realizadas con esta aproximación indican un incremento en la focalidad del marcaje y, por lo tanto, una mejora para el estudio de poblaciones celulares concretas. El problema principal radica en que

desconocemos el daño que puede ocasionar a largo plazo la bola de colágeno en el encéfalo embrionario.

### C. RETROVIRUS NO SILENCIANTES: NUEVA APROXIMACIÓN AL ANÁLISIS CLONAL FOCAL

Una aproximación frecuentemente utilizada para conseguir una focalidad extrema, llegando hasta el punto de trazado de célula única, es la utilización de virus (lenti- o retro-virus), los cuales se inyectan en el lugar deseado como vectores. El problema fundamental de los virus radica en que, a largo plazo, la gran mayoría se silencian o llegan a causar daños (como hidrocefalia). Otro problema es que pueden llegar a mostrarse selectivos en la expresión de la proteína fluorescente presente en las células infectadas (por ejemplo, tan sólo los astrocitos expresan GFP y no las neuronas; Figura 46). La mayoría de trabajos que utilizan virus, lo



**Figura 46.** Expresión selectiva de GFP únicamente en astrocitos (no en neuronas) conseguida mediante infección de retrovirus en estadios tempranos y estudiada a largo plazo, en animales postnatales.

hacen dejando periodos de supervivencia relativamente cortos pero, para nosotros, muchas de las veces es fundamental conocer en qué se diferencian las células que trazamos y para ello necesitamos una metodología a largo plazo no silenciante y focal.

Este problema ya es conocido por otros grupos de investigación, en concreto, en el laboratorio de Marcos Costa (Brain Institute, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Brazil) han creado virus con un promotor distinto al habitualmente utilizado, logrando una permanencia de éste a largo plazo. Se trata del promotor CAG y en sus versiones de expresión de GFP y de dsRed, para realizar un análisis clonal sencillo en el sistema nervioso en desarrollo, se juega con la probabilidad (y combinación) de que cada célula sea infectada por partículas virales que expresan GFP, virus que expresan dsRed o virus con ambas expresiones (Costa y col., 2009).

Con la finalidad de continuar en un futuro próximo con la caracterización de las distintas poblaciones estudiadas en esta tesis a nivel clonal, avanzamos un paso más para poder abordar la compleja heterogeneidad ontogénica de estas células. Trabajos recientes del laboratorio (García-Marqués y López-Mascaraque, 2013), presentan una técnica capaz de analizar un comportamiento clonal en astrocitos, basada en la transfección de una combinación de plásmidos de expresión de distintas

proteínas fluorescentes (distintas longitudes de emisión y absorción: GFP, YFP, mKO, etc.). Esta técnica, aprovecha la captación diferencial de los distintos plásmidos y su integración en el genoma, de tal modo que se obtienen células y su descendencia con un “código específico de colores”. Basándonos en esto, en la actualidad, pretendemos modificar esta aproximación metodológica de tal modo que sea aplicable para neuronas y no sólo para astrocitos, para ello hemos clonado las distintas proteínas fluorescentes en los plásmidos virales con promotor no silenciante. Con ello, pretendemos disponer de una herramienta que solucione, en resumen, las limitaciones encontradas hasta el momento en todas y cada una de las técnicas utilizadas, ganando focalidad e información clonal. Por lo tanto, nos proponemos utilizar estos virus como lanzadera hacia la aplicación de una nueva metodología que pretendemos implantar.

### **D. GANACIA DE INFORMACIÓN MEDIANTE INTEGRACIÓN PLASMÍDICA**

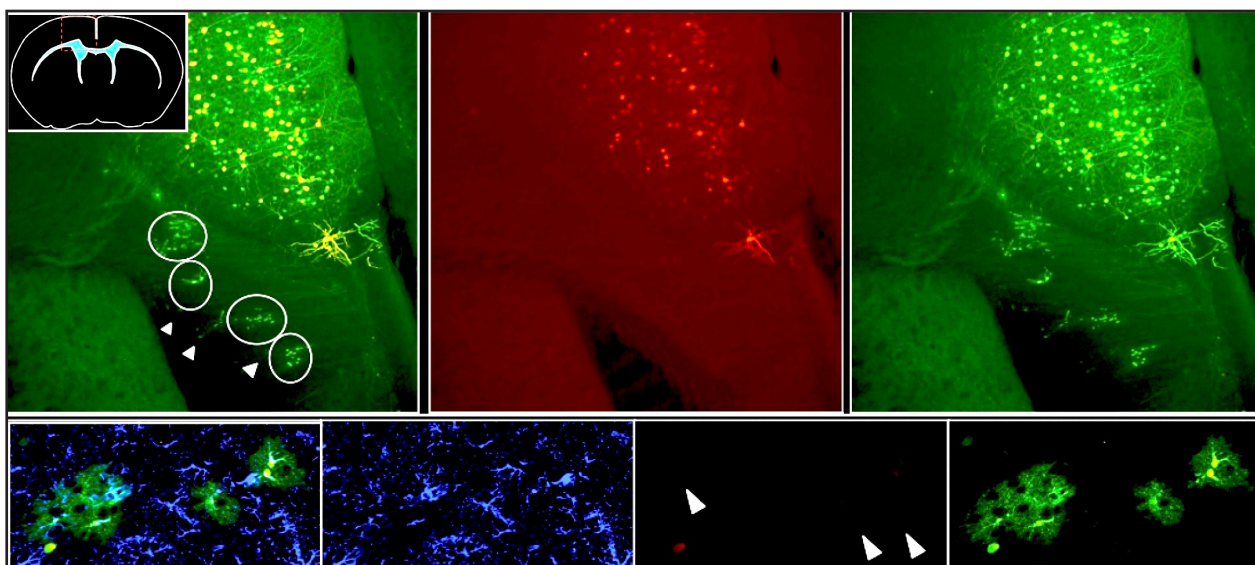
Siguiendo la línea del silenciamiento de los virus, otro de los problemas, pero esta vez de nuevo en base a la electroporación, es la dilución del plásmido electroporado en las sucesivas divisiones celulares. Obviamente, si el plásmido no está integrado en el genoma, a mayor número de divisiones mayor pérdida de copias del plásmido, teniendo por lo tanto una falta de información de las células que presentan más divisiones a largo plazo. Para

estudiar esto e incluso para solventar este inconveniente, realizamos electroporaciones de una mezcla plasmídica que contiene un plásmido que se integra en el genoma (con expresión de GFP; mediado por transposición por la enzima transposasa) y un plásmido no integrante (con expresión de Cherry; Figura 47). Tras esto, se observa una pérdida de expresión del plásmido no integrado frente

al integrado, siendo incluso exclusivo de ciertos tipos celulares, siempre en función de su comportamiento proliferativo. De hecho, esta pérdida no es banal, puesto que existen células en grupo que no presentan expresión del plásmido no integrado (Figura 48) y por lo tanto, al provenir de un número elevado de divisiones, no podríamos estudiarlas con las técnicas habituales.



**Figura 47.** Esquema que muestra la secuencia básica de los plásmidos utilizados con la finalidad de evitar una pérdida de información, mediante integración plasmídica. En la secuencia de la izquierda puede actuar la transposasa y por lo tanto, integrarse en el genoma y en la secuencia de la derecha se ha eliminado la secuencia en 3' reconocida por la transposasa, de tal modo que no puede ser integrado en el genoma.



**Figura 48.** Se muestra una transfección, mediante electroporación en estadios embrionarios y su posterior estudio en el adulto. Los plásmidos usados se detallan en la Figura 9. Se observan (círculos y flechas) grupos neurales en los que se da una pérdida del plásmido no transponible (en rojo; mCherry) y por lo tanto sólo se expresa el plásmido que expresa GFP (plásmido transponible), debido a que provienen de un número elevado de divisiones. En azul se observa el marcaje de GFAP. Las células que presentan colocalización de ambos plásmidos provienen de un número muy reducido de divisiones, ya que no han perdido el plásmido no integrado.

## CONCLUSIONES







1. Existe una **dinámica en la expresión** de los marcadores Tbr1, CB, CR, Reln a lo largo del **desarrollo** embrionario de la **corteza olfativa**.
2. La expresión de los marcadores **Tbr1 y CR** permanece constante a lo largo del desarrollo de corteza olfativa y, por lo tanto, se pueden asociar a estructuras específicas, siendo **marcadores válidos** de éstas.
3. **Tbr1** no se puede utilizar a modo de **marcador** celular específico de origen (derivados paliales) sino de área (**destino palial**).
4. El **palio ventral** y el **septum** son dos nuevas áreas de **generación** de células de **corteza olfativa**.
5. Desde las áreas germinativas del **palio ventral y el septum no** surgen células hacia **neocorteza**.
6. La **subplaca** posee, al menos, dos áreas de **generación**: una local (en el **neuroepitelio cortical**) y otra extracortical (el **muro medial rostral telencefálico**).
7. El muro medial rostral telencefálico da lugar a **células corticales de proyección** que migran **tangencialmente** para colonizar la neocorteza.
8. El muro medial rostral telencefálico, **estructura palial**, da lugar a células **GABAérgicas** de neocorteza.
9. Las **técnicas** comúnmente utilizadas en la actualidad para **determinar migraciones** celulares durante el desarrollo, poseen **inconvenientes** por los cuales existe una pérdida de información durante el proceso de trazado, proponiendo en la presente tesis **mejoras** a estas técnicas.



## REFERENCIAS





- Allendoerfer KL, Shatz CJ (1994) The subplate, a transient neocortical structure: its role in the development of connections between thalamus and cortex. *Annu Rev Neurosci* 17: 185--218.
- Anderson SA, Eisenstat DD, Shi L, Rubenstein JL (1997) Interneuron migration from basal forebrain to neocortex: dependence of *Dlx* genes. *Science* 278: 474-476.
- Araque A (2008) Astrocytes process synaptic information. *Neuron Glia Biol* 4: 3-10.
- Angevine JB, Sidman RL (1961) Autoradiographic study of cell migration during histogenesis of cerebral cortex in the mouse. *Nature* 192: 766--768.
- Arimatsu Y, Ishida M, Kaneko T, Ichinose S, Omori A (2003) Organization and development of corticocortical associative neurons expressing the orphan nuclear receptor *Nurr1*. *J Comp Neurol* 466: 180-196.
- Bayer SA, Altman J (1990) Development of layer I and the subplate in the rat neocortex. *Exp Neurol* 107: 48-62.
- Bielle F, Griveau A, Narboux-Nême N, Vigneau S, Sigrist M, Arber S, Wassef M, Pierani A (2005) Multiple origins of Cajal-Retzius cells at the borders of the developing pallium. *Nat Neurosci* 8: 1002-1012.
- Blakemore C, Molnár Z (1990) Factors involved in the establishment of specific interconnections between thalamus and cerebral cortex. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 55: 491--504.
- Blom HJ, Shaw GM, Heijer M, Finnell RH (2006) Neural tube defects and folate: case far from closed. *Nat Rev Neurosci* 7: 724-731.
- Bulfone A, Smiga SM, Shimamura K, Peterson A, Puelles L, Rubenstein JL (1995) *T-brain-1*: a homolog of *Brachyury* whose expression defines molecularly distinct domains within the cerebral cortex. *Neuron* 15: 63-78.
- Carney RS, Alfonso TB, Cohen D, Dai H, Nery S, Stoica B, Slotkin J, Bregman BS, Fishell G, Corbin JG (2006) Cell migration along the lateral cortical stream to the developing basal telencephalic limbic system. *J Neurosci* 26: 11562-11574.
- Ceci ML, López-Mascaraque L, De Carlos JA (2010) The influence of the environment on Cajal-Retzius cell migration. *Cereb. Cortex* 20: 2348-2360.
- Ceci ML, Pedraza M, De Carlos JA (2012) The embryonic septum and ventral pallium, new sources of olfactory cortex cells. *PLoS One* 7:e44716.
- Chun JJ, Shatz CJ (1989) The earliest-generated neurons of the cat cerebral cortex: characterization by MAP2 and neurotransmitter immunohistochemistry during fetal life. *J Neurosci* 9: 1648-1667.
- Costa MR, Bucholz O, Schroeder T, Götz M (2009) Late origin of glia-restricted progenitors in the developing mouse cerebral cortex. *Cereb Cortex* 2009 1: 135-143.
- De Carlos JA, García-Moreno F (2009) Tangential cell movements during early



- telencephalic development. En: Ribak CE, de la Hoz C, Jones JA, Larriva-Sahd J, Swanson LW, editores. Development to degeneration and regeneration of the nervous system. Oxford University Press. pp. 19-44.
- De Carlos JA, López- Mascaraque L, Valverde F (1996) Dynamics of cell migration from the lateral ganglionic eminence in the rat. *J Neurosci* 16: 6146-6156.
  - De Carlos JA, O'Leary DD (1992) Growth and targeting of subplate axons and establishment of major cortical pathways. *J Neurosci* 12: 1194-1211.
  - Dixit R, Zimmer C, Waclaw RR, Mattar P, Shaker T, Kovach C, Logan C, Campbell K, Guillemot F, Schuurmans C (2011) *Ascl1* participates in Cajal-Retzius cell development in the neocortex. *Cereb Cortex* 21: 2599-2611.
  - Echelard Y, Epstein DJ, St-Jacques B, Shen L, Mohler J, McMahon JA, McMahon AP (1993) Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell* 75: 1417-1430.
  - Fan, C.M., Tessier-Lavigne, M. (1994). Patterning of mammalian somites by surface ectoderm and notochord: evidence for sclerotome induction by a hedgehog homolog. *Cell* 79: 1175-1186.
  - Friauf E, Shatz CJ (1991) Changing patterns of synaptic input to subplate and cortical plate during development of visual cortex. *J Neurophysiol* 66: 2059--2071.
  - Garcia-Lopez R, Martinez S (2010) Oligodendrocyte precursors originate in the parabasal band of the basal plate in prosomere 1 and migrate into the alar prosencephalon during chick development. *Glia* 58: 1437-1450.
  - García-Marqués J, López-Mascaraque L (2013) Clonal Identity Determines Astrocyte Cortical Heterogeneity. *Cereb Cortex* 23: 1463-1472.
  - García-Moreno F, López-Mascaraque L, De Carlos JA (2007) Origins and migratory routes of murine Cajal-Retzius cells. *J Comp Neurol* 500: 419-432.
  - García-Moreno F, López-Mascaraque L, De Carlos JA (2008) Early telencephalic migration topographically converging in the olfactory cortex. *Cereb Cortex* 18: 1239-1252.
  - García-Moreno F, Pedraza M, Di Giovannantonio LG, Di Salvio M, López-Mascaraque L, Simeone A, De Carlos JA (2010) A neuronal migratory pathway crossing from diencephalon to telencephalon populates amygdala nuclei. *Nat Neurosci* 13: 680- 689.
  - Gelman D, Griveau A, Dehorter N, Teissier A, Varela C, Pla R, Pierani A, Marín O (2011) A wide diversity of cortical GABAergic interneurons derives from the embryonic preoptic area. *J Neurosci* 31: 16570-16580.
  - Gelman DM, Martini FJ, Nóbrega-Pereira S, Pierani A, Kessaris N, Marín O (2009) The embryonic preoptic area is a novel source of

cortical GABAergic interneurons. *J Neurosci* 29: 9380-9389.

- Ghosh A, Antonini A, McConnell SK, Shatz CJ (1990) Requirement for subplate neurons in the formation of thalamocortical connections. *Nature* 347: 179–181.

- Ghosh A, Shatz CJ (1994) Segregation of geniculocortical afferents during the critical period: a role for subplate neurons. *J Neurosci* 14: 3862–3880.

- Goffinet AM, Bar I, Bernier B, Trujillo C, Raynaud A, Meyer G (1999) Reelin expression during embryonic brain development in lacertilian lizards. *J Comp Neurol* 414: 533-550.

- Grove EA, Tole S, Limon J, Yip L, Ragsdale CW (1998) The hem of the embryonic cerebral cortex is defined by the expression of multiple Wnt genes and is compromised in Gli3-deficient mice. *Development* 125: 2315-2325.

- Haberly LB (2001) Parallel-distributed processing in olfactory cortex: new insights from morphological and physiological analysis of neural circuitry. *Chem Senses* 26: 551-576.

- Hanganu IL, Kilb W, Luhmann HJ (2001) Spontaneous synaptic activity of subplate neurons in neonatal rat somatosensory cortex. *Cereb Cortex* 11: 400–410.

- He W, Ingraham C, Rising L, Goderie S, Temple S (2001) Multipotent stem cells from the mouse basal forebrain contribute

GABAergic neurons and oligodendrocytes to the cerebral cortex during embryogenesis. *J Neurosci* 21: 8854-8862.

- Heuer H, Christ S, Friedrichsen S, Brauer D, Winckler M, Bauer K, Raivich G (2003) Connective tissue growth factor: a novel marker of layer VII neurons in the rat cerebral cortex. *Neuroscience* 119: 43-52.

- Hevner RF, Neogi T, Englund C, Daza RA, Fink A (2003) Cajal-Retzius cells in the mouse: transcription factors, neurotransmitters, and birthdays suggest a pallial origin. *Brain Res Dev Brain Res* 141: 39-53.

- Hevner RF, Zecevic N (2006) Pioneer neurons and interneurons in the developing subplate: molecular markers, cell birthdays, and neurotransmitters. En: Erzurumlu RS, Guido W, Molnár Z, editors. *Development and Plasticity in Sensory Thalamus and Cortex*. New York: Springer. pp. 1–17.

- Higashi S, Molnár Z, Kurotani T, Inokawa H, Toyama K (2002) Functional thalamocortical connections develop during embryonic period in the rat: an optical recording study. *Neuroscience* 115: 1231--1246.

- Hoerder-Suabedissen A, Molnár Z (2013) Molecular diversity of early-born subplate neurons. *Cereb Cortex* 23: 1473-1483.

- Hoerder-Suabedissen A, Oeschger FM, Krishnan ML, Belgard TG, Wang WZ, Lee S, Webber C, Petretto E, Edwards AD, Molnár Z (2013) Expression profiling of mouse subplate reveals a dynamic gene network and disease

association with autism and schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 3555-3560.

- Hoerder-Suabedissen A, Wang WZ, Lee S, Davies KE, Goffinet AM, Rakić S, Parnavelas J, Reim K, Nicolić M, Paulsen O, Molnár Z (2009) Novel markers reveal subpopulations of subplate neurons in the murine cerebral cortex. *Cereb Cortex* 19: 1738-1750.

- Hunter KE, Hatten ME (1995) Radial glial cell transformation to astrocytes is bidirectional: Regulation by a diffusible factor in embryonic forebrain. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 2061–2065.

- Jiménez D, Riviera R, López- Mascaraque L, De Carlos JA (2003) Origin of the cortical layer I in rodents. *Dev Neurosci* 25: 105- 115.

- Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM (2001) *Principios de neurociencia*. 4ª edición, McGraw-Hill/Interamericana

- Kanold PO, Kara P, Reid RC, Shatz CJ (2003) Role of subplate neurons in functional maturation of visual cortical columns. *Science* 301: 521--525.

- Kanold PO, Luhmann HJ (2010) The subplate and early cortical circuits. *Ann Rev Neurosci* 33: 23–48.

- Koester SE, O’Leary DD (1994) Axons of early generated neurons in cingulate cortex pioneer the corpus callosum. *J Neurosci* 14:6608- 6620.

- Kostović I, Judas M, Sedmak G (2011) Developmental history of the subplate zone, subplate neurons and interstitial white

matter neurons: relevance for schizophrenia. *Int J Devl Neuroscience* 29: 193–205.

- Kostović I, Rakic P (1990) Developmental history of the transient subplate zone in the visual and somatosensory cortex of the macaque monkey and human brain. *J Comp Neurol* 297: 441–470.

- Lavdas AA, Mione MC, Parnavelas JG (1996) Neuronal Clones in the Cerebral Cortex Show Morphological and Neurotransmitter Heterogeneity during Development. *Cereb Cortex* 6:490-497.

- Lee KJ, Jessell TM (1999) The specification of dorsal cell fates in the vertebrate central nervous system. *Annu Rev Neurosci* 22: 261-294.

- Liem KF Jr, Jessell TM, Briscoe J (2000) Regulation of the neural patterning activity of sonic hedgehog by secreted BMP inhibitors expressed by notochord and somites. *Development* 127: 4855-4866.

- Liu N, Baker H (1999) Activity-dependent *Nurr1* and *NGFI-B* gene expression in adult mouse olfactory bulb. *Neuroreport* 10: 747-751.

- López-Bendito G, Molnár Z (2003) Thalamocortical development: how are we going to get there? *Nat Rev Neurosci* 4: 276-289.

- Lukaszewicz A, Savatier P, Cortay V, Giroud P, Huissoud C, Berland M, Kennedy H, Dehay C (2005) G1 phase regulation, area-specific cell cycle control, and cytoarchitectonics in the

- primate cortex. *Neuron* 47: 353–364.
- Luskin MB, Shatz CJ (1985) Neurogenesis of the cat's primary visual cortex. *J Comp Neurol* 242: 611–631.
  - Marin-Padilla M (1971) Early prenatal ontogenesis of the cerebral cortex (neocortex) of the cat (*Felis domestica*). A Golgi study. I. The primordial neocortical organization. *Z Anat Entwicklungsgesch* 134: 117–145.
  - Marin-Padilla M (1978) Dual origin of the mammalian neocortex and evolution of the cortical plate. *Anat Embryol* 152: 109–126.
  - Martí E, Bumcrot DA, Takada R, McMahon AP (1995) Requirement of 19K form of Sonic hedgehog for induction of distinct ventral cell types in CNS explants. *Nature* 375: 322–325.
  - McConnell K, Ghosh A, Shatz CJ (1989) Subplate neurons pioneer the first axon pathway from the cerebral cortex. *Science* 245: 978–982.
  - Meyer G, Cabrera Socorro A, Pérez García CG, Martínez Millán L, Walker N, Caput D (2004) Developmental roles of p73 in Cajal-Retzius cells and cortical patterning. *J Neurosci* 24: 9878–9887.
  - Meyer G, Pérez-García CG, Gleeson JG (2002) Selective expression of doublecortin and LIS1 in developing human cortex suggests unique modes of neuronal movement. *Cereb Cortex* 12: 1225–1236.
  - Meynert T (1867) *Der Bau der Grosshirnrinde und seine örtlichen Verschiedenheiten, nebst einem pathologisch-anatomischen Corollarium*. *Vierteljschr Psychiat* 1, 77–93, 126–170, 198–217.
  - Miyoshi G, Fishell G (2011) GABAergic interneuron lineages selectively sort into specific cortical layers during early postnatal development. *Cereb Cortex* 21: 845–852.
  - Molnár Z, Higashi S, López-Bendito G (2003) Choreography of early thalamocortical development. *Cereb Cortex* 13: 661–669.
  - Molnár Z, Adams R, Goffinet AM, Blakemore C (1998) The role of the first postmitotic cortical cells in the development of thalamocortical innervation in the reeler mouse. *J Neurosci* 18: 5746–5765.
  - Montiel JF, Wang WZ, Oeschger FM, Hoerder-Suabedissen A, Tung WL, García-Moreno F, Holm IE, Villalón A, Molnár Z (2011) Hypothesis on the dual origin of the mammalian subplate. *Front Neuroanat* 5: 25.
  - Morgenstern JP, Land HA (1990) Series of mammalian expression vectors and characterisation of their expression of a reporter gene in stably and transiently transfected cells. *Nucleic Acids Res* 18: 1068–1073.
  - Myakhar O, Unichenko P, Kirischuk S (2011) GABAergic projections from the subplate to Cajal-Retzius cells in the neocortex. *Neuroreport* 22: 525–529.
  - Noctor SC, Flint AC, Weissman TA, Dammerman RS, Kriegstein AR (2001) Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature*

409: 714-720.

- Oeschger FM, Wang WZ, Lee S, García-Moreno F, Goffinet AM, Arbonés ML, Rakic S, Molnár Z (2012) Gene expression analysis of the embryonic subplate. *Cereb Cortex* 22: 1343-1359.

- Olivier C, Cobos I, Perez Villegas EM, Spassky N, Zalc B, Martinez S, Thomas JL (2001) Monofocal origin of telencephalic oligodendrocytes in the anterior entopeduncular area of the chick embryo. *Development* 128: 1757-1769.

- O'Rourke NA, Dailey ME, Smith SJ, McConnell SK (1992) Diverse migratory pathways in the developing cerebral cortex. *Science* 258: 299-302.

- Price DJ, Aslam S, Tasker L, Gillies K (1997) Fates of the earliest generated cells in the developing murine neocortex. *J Comp Neurol* 377: 414-422.

- Price J, Thurlow L (1988) Cell lineage in the rat cerebral cortex: a study using retroviral-mediated gene transfer. *Development* 104: 473-482.

- Puelles L, Kuwana E, Puelles E, Bulfone A, Shimamura K, Keleher J, Smiga S, Rubenstein JL (2000) Pallial and subpallial derivatives in the embryonic chick and mouse telencephalon, traced by the expression of the genes *Dlx-2*, *Emx-1*, *Nkx-2.1*, *Pax-6*, and *Tbr-1*. *J Comp Neurol* 424: 409-438.

- Rakic P (1972) Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex.

*J Comp Neurol* 145: 61-84.

- Rakic P (1977) Prenatal development of the visual system in rhesus monkey. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 278: 245-260.

- Rakic P, Sidman RL (1968) Subcommissural organ and adjacent ependyma: autoradiographic study of their origin in the mouse brain. *Am J Anat* 122: 317-335.

- Rakic P (2007) The radial edifice of cortical architecture: From neuronal silhouettes to genetic engineering. *Brain Res Rev* 55: 204-219.

- Ramón y Cajal S (1890) Sobre la existencia de células nerviosas especiales en la primera capa de las circunvoluciones cerebrales. *Gaceta Med Catalana* 13: 737-739.

- Ramón y Cajal S (1891b) Sur la structure de l'écorce cérébrale de quelques mammifères. *La Cellule* 7: 125-176.

- Reid CB, Walsh CA (2002) Evidence of common progenitors and patterns of dispersion in rat striatum and cerebral cortex. *J Neurosci* 22: 4002-4014.

- Retzius G (1893) Die Cajal'schen Zellen der Grosshirnrinde beim Menschen und bei Säugetieren. *Biol Untersuchungen Neue Folge* 5: 1-8.

- Schneider S, Gulacsi A, Hatten ME (2011) *Lrp12/Mig13a* reveals changing patterns of preplate neuronal polarity during corticogenesis that are absent in *reeler* mutant mice. *Cereb Cortex* 21: 134-144.



- Smart IH, Dehay C, Giroud P, Berland M, Kennedy H (2002) Unique morphological features of the proliferative zones and postmitotic compartments of the neural epithelium giving rise to striate and extrastriate cortex in the monkey. *Cereb Cortex* 12: 37–53.
- Stoykova A, Hatano O, Gruss P, Götz M (2003) Increase in reelin-positive cells in the marginal zone of Pax6 mutant mouse cortex. *Cereb Cortex* 13: 560-571.
- Stoykova A, Treichel D, Hallonet M, Gruss P (2000) Pax6 modulates the dorsoventral patterning of the mammalian telencephalon. *J Neurosci* 20: 8042-8050.
- Takiguchi-Hayashi K, Sekiguchi M, Ashigaki S, Takamatsu M, Hasegawa H, Suzuki-Migishima R, Yokoyama M, Nakanishi S, Tanabe Y (2004) Generation of reelin-positive marginal zone cells from the caudomedial wall of telencephalic vesicles. *J Neurosci* 24: 2286-2295.
- Tamamaki N, Fujimori KE, Takauji R (1997) Origin and route of tangentially migrating neurons in the developing neocortical intermediate zone. *J Neurosci* 17: 8313-8323.
- Tamamaki N, Nakamura K, Okamoto K, Kaneko T (2001) Radial glia is a progenitor of neocortical neurons in the developing cerebral cortex. *Neurosci Res* 41: 51-60.
- Teissier A, Griveau A, Vigier L, Piolot T, Borello U, Pierani A (2010) A novel transient glutamatergic population migrating from the pallial-subpallial boundary contributes to neocortical development. *J Neurosci* 30: 10563-10574.
- Torres-Reveron J, Friedlander MJ (2007) Properties of persistent postnatal cortical subplate neurons. *J Neurosci*. 27: 9962--9974.
- Van Gehuchten A (1891) La structure des centres nerveux: La moelle épinière et le cervelet. *La Cellule* 7: 79-122.
- Walsh C, Cepko CL (1988) Clonally related cortical cells show several migration patterns. *Science* 241: 1342-1345.
- Yun K, Potter S, and Rubenstein JL (2001) Gsh2 and Pax6 play complementary roles in dorsoventral patterning of the mammalian telencephalon. *Development* 128: 193-205.
- Yusa, K., Rad, R., Takeda, J., Bradley, A. (2009) Generation of transgene-free induced pluripotent mouse stem cells by the piggyBac transposon. *Nat Methods* 6: 363–369.
- Zimmer C, Lee J, Griveau A, Arber S, Pierani A, Garel S, Guillemot F (2010) Role of Fgf8 signalling in the specification of rostral Cajal-Retzius cells. *Development* 137: 293-302.



## ANEXOS







# A further analysis of olfactory cortex development

**María Pedraza and Juan A. De Carlos\***

Lab of Telencephalic Development (A-21), Department of Molecular, Cellular and Developmental Neuroscience, Instituto Cajal (Consejo Superior de Investigaciones Científicas), Madrid, Spain

## Edited by:

Jorge A. Larriva-Sahd, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico

## Reviewed by:

Antonio Pereira, Federal University of Rio Grande do Norte, Brazil  
Patricia Gaspar, INSERM, France  
Veronica Martinez-Cerdeno, University of California at Davis, USA

## \*Correspondence:

Juan A. De Carlos, Lab of Telencephalic Development (A-21), Department of Molecular, Cellular and Developmental Neuroscience, Instituto Cajal (Consejo Superior de Investigaciones Científicas), Avenida del Doctor Arce, 37, Madrid, Spain.  
e-mail: decarlos@cajal.csic.es

The olfactory cortex (OC) is a complex yet evolutionarily well-conserved brain region, made up of heterogeneous cell populations that originate in different areas of the developing telencephalon. Indeed, these cells are among the first cortical neurons to differentiate. To date, the development of the OC has been analyzed using birthdating techniques along with molecular markers and *in vivo* or *in vitro* tracking methods. In the present study, we sought to determine the origin and adult fate of these cell populations using ultrasound-guided *in utero* injections and electroporation of different genomic plasmids into the lateral walls of the ventricles. Our results provide direct evidence that in the mouse OC, cell fate is determined by the moment and place of origin of each specific cell populations. Moreover, by combining these approaches with the analysis of specific cell markers, we show that the presence of pallial and subpallial markers in these areas is independent of cell origin.

**Keywords:** mouse, olfactory system, pallium, subpallium, Tbr1

## INTRODUCTION

The cell populations that give rise to different structures during the embryonic development of the nervous system originate in multiple and distinct germinative regions, frequently far from the site at which they ultimately settle. These cells migrate along well-established routes to occupy their final position and differentiate into adult neurons. Accordingly, neuroblast displacement is a source of cellular variability in any given structure. Neuroblasts migrate using radial and/or tangential migratory pathways. While radial movement involves the use of the radial glia as a scaffold (Rakic, 1972), tangential migration occurs independent of glial cells and follows an orthogonal route, parallel to the pial surface. This latter form of migration allows migratory cells to colonize locations at a significant distance from their origin (De Carlos et al., 1996; García-Moreno et al., 2010).

It has been proposed that each encephalic structure is comprised of multiple cell populations that are generated at diverse locations during a specific embryonic time-window, each expressing distinctive cell markers (García-Moreno et al., 2008). However, extreme caution is required when attributing a specific marker to a given cell population, which may display non-uniform expression during its spatio-temporal development. Several specific markers for distinct areas of the nervous system have been described. For example, the telencephalon is anatomically divided into the pallium and subpallium, due to the influence of dorsal (Lee and Jessell, 1999; Liem et al., 2000) and ventral (Echelard et al., 1993; Fan and Tessier-Lavigne, 1994; Martí et al., 1995) cues during development. These zones give rise to cell populations that express specific markers, such as the T-box brain 1 (Tbr1), proposed to be a typical marker of pallium-derived cells (Puelles et al., 2000). However, Tbr1 expression in pallial cells

has also been described, regardless of their site of origin (Bulfone et al., 1995).

The olfactory cortex (OC) is composed of a variety of structures located in the most ventrolateral region of the mammalian telencephalon, namely the anterior olfactory nucleus, olfactory tubercle (OT), piriform cortex (PC), olfactory amygdaloid nuclei, and entorhinal cortex (EC). Efferent projections from the olfactory bulb converge to form the lateral olfactory tract (lot), which runs through the outer portion of the PC. In rodents, the OC is one of the first structures to form in the telencephalon, even before the neocortex (García-Moreno et al., 2008). Several proliferative areas have been described from which cells migrate toward the OC, specifically colonizing the PC and OT. These include the lateral ganglionic eminence (LGE), dorsal telencephalon, rostro-medial telencephalic wall, and the septoeminent sulcus. Each area gives rise to a cell population expressing specific markers in the embryo, including Tbr1, calretinin (CR), calbindin (CB), and reelin (Reln). However, the differentiation of these cells, which are derived from distinct germinative areas, and their expression during the development of the OC remain poorly understood. To better understand how this structure matures and how the distinct cell populations that contribute to this tissue are established, we have studied the expression of specific markers (Tbr1, CR, CB, and Reln) during the development of the OC.

## MATERIALS AND METHODS

### ANIMALS

C57BL6 mice were raised at the animal facility of the Cajal Institute, in compliance with the current Spanish legislation (R.D. 1201/2005 and L.32/2007) and European Union





# The Embryonic Septum and Ventral Pallium, New Sources of Olfactory Cortex Cells

María Laura Ceci<sup>1</sup>✉, María Pedraza<sup>2</sup>✉, Juan A. de Carlos<sup>2\*</sup>

**1** University of Chile, Las Encinas, Santiago, Chile, **2** Department of Molecular, Cellular and Developmental Neurobiology, Instituto Cajal- Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, Spain

## Abstract

The mammalian olfactory cortex is a complex structure located along the rostro-caudal extension of the ventrolateral prosencephalon, which is divided into several anatomically and functionally distinct areas: the anterior olfactory nucleus, piriform cortex, olfactory tubercle, amygdaloid olfactory nuclei, and the more caudal entorhinal cortex. Multiple forebrain progenitor domains contribute to the cellular diversity of the olfactory cortex, which is invaded simultaneously by cells originating in distinct germinal areas in the dorsal and ventral forebrain. Using a combination of dye labeling techniques, we identified two novel areas that contribute cells to the developing olfactory cortices, the septum and the ventral pallium, from which cells migrate along a radial and then a tangential path. We characterized these cell populations by comparing their expression of calretinin, calbindin, reelin and Tbr1 with that of other olfactory cell populations.

**Citation:** Ceci ML, Pedraza M, de Carlos JA (2012) The Embryonic Septum and Ventral Pallium, New Sources of Olfactory Cortex Cells. PLoS ONE 7(9): e44716. doi:10.1371/journal.pone.0044716

**Editor:** Manuel S. Malmierca, University of Salamanca- Institute for Neuroscience of Castille and Leon and Medical School, Spain

**Received:** April 30, 2012; **Accepted:** August 6, 2012; **Published:** September 11, 2012

**Copyright:** © 2012 Ceci et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was supported by grant BFU2010-21377 from the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: decarlos@cajal.csic.es

✉ These authors contributed equally to this work.

## Introduction

Migration is an essential process in the development of the nervous system, allowing newly generated cells to reach sites far from their origin. Indeed, all nervous system structures represent aggregates of distinct cell populations that are actually generated in distinct areas, each expressing different cell markers and using specific migratory pathways to reach their final target destinations. Two main migratory mechanisms have been described in the nervous system: radial and tangential migration (for review see [1]). While the former is dependent on radial glia cells and generally involves cell migration over short distances [2], tangential migration occurs independently of glia cells and it is more widespread in earlier developmental stages, before glial cell maturation [3–5]. These migratory pathways can overcome barriers between different developmental vesicles, with no limit to the distances over which cells can migrate.

The sources of cells that form specific encephalic structures are often investigated using tissue slices that are labeled and cultured in plates, whereas in the present study we have analyzed cell migration during development in whole embryos. This approach ensures that rostro-caudal migratory routes develop normally, thereby circumventing several drawbacks of the tissue slice approach, including the loss of targets and cell guidance cues and the erroneous migration of newly generated cells.

We previously demonstrated that olfactory cortex cells are generated in most telencephalic proliferative areas just before the cortical preplate is split by the accumulation of newly generated cortical plate cells [4]. In the present study, we focused on two proliferative areas not featured in our previous analyses, the septal

area and the ventral pallium (the pallial region located next to the pallium-subpallium boundary). Using fluorescent tracer injections, we characterized the migratory pathways of cells of septal and ventral pallial origin at different developmental stages (E10.5 to E12.5) to determine the individual contributions of these proliferative regions to the developing brain. Moreover, we investigated whether these regions give rise to olfactory cortex cells during this developmental window, or to more heterogeneous populations that can also reach the cerebral cortex, as proposed by other authors [6–8].

## Results

### Cell Migration from the Septum

To determine the fate of cells generated in the septal area at E10.5 and E11.5, fluorescent tracers (CFDA or DiI) were injected *ex utero* into whole embryos that were then cultured in roller bottles for 24 hours. Embryos injected at E10.5 exhibited very few cells of septal origin (Fig. 1 A), which initially followed a ventral migratory pathway and subsequently switched to a lateral pathway to move away from the midline through the outermost subpallial layer. The cells then migrated caudally to ultimately reach the mid-region of the telencephalon in the rostro-caudal axis (Fig. 1 A–D). One day after septal injections in E11.5 embryos, large scale migration of labeled cells was observed along ventral and lateral routes in the direction of the olfactory cortex (Fig. 1 E–H). The cells initially migrated radially from the septal ventricular zone to the outermost layer, subsequently migrating tangentially through the diagonal band of Broca (DBB) to reach the olfactory tubercle and piriform cortex (Fig. 1 I–T). These cells exhibited complex



## ARTICLES

nature  
neuroscience

# A neuronal migratory pathway crossing from diencephalon to telencephalon populates amygdala nuclei

Fernando García-Moreno<sup>1</sup>, María Pedraza<sup>1</sup>, Luca G Di Giovannantonio<sup>2</sup>, Michela Di Salvio<sup>2</sup>, Laura López-Mascaraque<sup>1</sup>, Antonio Simeone<sup>2-4</sup> & Juan A De Carlos<sup>1</sup>

Neurons usually migrate and differentiate in one particular encephalic vesicle. We identified a murine population of diencephalic neurons that colonized the telencephalic amygdaloid complex, migrating along a tangential route that crosses a boundary between developing brain vesicles. The diencephalic transcription factor OTP was necessary for this migratory behavior.

The amygdala is a functionally and structurally heterogeneous complex of nuclei<sup>1</sup> located in the ventro-caudal telencephalon that is important for processing and memory of emotional reactions. On the basis of structural, functional and developmental features, the amygdala is divided into four groups of nuclei and a rostro-medial extension called the extended amygdala that includes the bed nuclei of the stria terminalis (BST) and the substantia innominata<sup>2-4</sup>. In terms of embryological origin, the amygdala consists of two groups of nuclei<sup>5,6</sup> that arise from pallial<sup>7-10</sup> and subpallial<sup>11-14</sup> compartments, although some amygdaloid nuclei are of mixed developmental origin. The medial amygdaloid nucleus (MeA) that forms the vomeronasal amygdala, along with the posterior-medial cortical amygdaloid nucleus (PMc), express genes that are typical of both telencephalic subdivisions and they receive cells from each component<sup>11,15,16</sup>. Moreover, the expression of certain diencephalic genes, such as *Orthopedia* (*Otp*)<sup>17,18</sup>, *Single disabled-mind 1* (*Sim1*)<sup>19</sup> and *Brain-2* (*Brn2*)<sup>20</sup>, suggests that some amygdaloid nuclei have a dual prosencephalic origin<sup>14,21-23</sup>.

*Otp* is a highly conserved gene encoding a homeodomain transcription factor that is specifically associated with the development of the hypothalamus in vertebrates<sup>18,24</sup>. *Otp* is essential for the differentiation of neuroendocrine hypothalamic neurons associated with the paraventricular hypothalamic (PVH) and supraoptic nuclei<sup>17,25,26</sup>. However, as such neurons are absent from amygdaloid nuclei, *Otp* might have a different role in this system. It is not clear whether OTP-expressing cells can reach telencephalic structures from their origins in diencephalic germinative zones or whether these cells are originally telencephalic and they simply express OTP once they become independent of the hypothalamus.

We examined the development of the telencephalic OTP-expressing cell population to determine whether cells generated in the hypothalamus colonize the telencephalon. We identified a route of

tangential cell migration in which cells expressing OTP transgress the di-telencephalic junction (DTJ). Subsequently, we used different *in utero* approaches to determine whether OTP expression was necessary for these cells to migrate toward their targets. The cells that migrated along this pathway originated exclusively in the rostro-dorsal hypothalamic ventricular zone and were targeted to several amygdaloid nuclei. These diencephalic migratory cells expressed OTP and were spatially related to the stria terminalis. Hypothalamic cells no longer colonized the amygdala when OTP expression was silenced and they failed to migrate along this pathway, as was evident in *Otp*<sup>-/-</sup> mice. Our data indicate that some amygdaloid nuclei are composed of a complex mixture of cells of diencephalic-telencephalic origin and identify the migratory pathway followed by hypothalamic neurons to reach these nuclei and a transcription factor that controls this process.

## RESULTS

### OTP expression during development

*Otp* is believed to be exclusively involved in the development of the hypothalamic neuroendocrine lineage<sup>27</sup>. We examined the spatiotemporal expression of murine OTP protein during embryonic brain development. We first detected OTP protein at embryonic day 10 (E10) in the ventral diencephalon and in the mantle of the dorsal and ventral hypothalamic areas (Fig. 1a–c). These domains probably belong to the PVH (Fig. 1b and Supplementary Table 1) and the ventro-medial hypothalamic nucleus (VMH; Fig. 1c), respectively. At E11, a similar pattern of OTP expression was detected in the hypothalamus, together with some labeling at the DTJ (Fig. 1d–g). Indeed, several OTP-immunoreactive cells were located at the boundary between both vesicles (Fig. 1f,g), suggesting that cells generated earlier had migrated from the hypothalamus toward the telencephalon. As development progressed, the number of

<sup>1</sup>Instituto Cajal (Consejo Superior de Investigaciones Científicas), Laboratory of Telencephalic Development, Molecular, Cellular and Developmental Neurobiology Department, Madrid, Spain. <sup>2</sup>CEINGE Biotecnologie Avanzate, Naples, Italy. <sup>3</sup>Scuola Europea di Medicina Molecolare, Naples, Italy. <sup>4</sup>Institute of Genetics and Biophysics 'A. Buzzati-Traverso', Consiglio Nazionale delle Ricerche, Naples, Italy. Correspondence should be addressed to J.A.D.C. (decarlos@cajal.csic.es).

Received 25 January; accepted 19 April; published online 23 May 2010; doi:10.1038/nn.2556





